

**Einfluss von Minocyclin und Indometacin auf  
trainingsinduzierte Neurogenese nach experimentellen  
Schlaganfällen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Nadja Schlegel

geboren am 01. Dezember 1983 in Werdau

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. Christoph Redecker, Jena
2. Prof. Dr. Ralf Stumm, Jena
3. Prof. Dr. Sebastian Jander, Düsseldorf

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.06.2014**

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5- Bromo- 2- desoxy- Uridin
CA	(lat.) <i>Cornu Ammonis</i> (Region des Hippocampus)
CD	(engl.) <i>cluster of differentiation</i>
COX	Cyclooxygenase
DAB	3'-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED1	(engl.) <i>rat monoclonal antibody to CD68</i> (zytochemischer Antikörper für aktivierte Mikrogliazellen)
GZL	Körnerzellschicht
Iba1	(engl.) <i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i> (zytochemischer Antikörper für residente Mikrogliazellen)
IL	Interleukin
Indo	Indometacin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
Mino	Minocyclin
MMP	Matrixmetalloproteinase
NeuN	(engl.) <i>neuronal nuclear antigene</i> (neuronaler Antikörper)
R-Indo	Versuchsgruppe mit Greiftraining (,R' für engl. <i>Reaching</i> = Greifen) und Indometacin- Behandlung
R-Mino	Versuchsgruppe mit Greiftraining (,R' für engl. <i>Reaching</i> = Greifen) und Minocyclin- Behandlung
R-Ctrl	Versuchsgruppe mit Greiftraining (,S' für Standardbehandlung) und Natriumchlorid- Behandlung

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	(engl.) <i>reactive oxygen species</i> (Sauerstoffradikale)
S-Ctrl	Versuchsgruppe ohne Greiftraining („S“ für Standardbehandlung) und Natriumchlorid- Behandlung
SGZ	Subgranulärzone
TBS	Tris-gepufferte Normalsalzlösung
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	1
<b>2 Einleitung</b> .....	3
2.1 Neurogenese im adulten Hippocampus .....	3
2.2 Neurogenese und körperliche Aktivität .....	5
2.3 Neurogenese nach dem Schlaganfall .....	7
2.4 Postläsionelle Inflammation und Neurogenese .....	9
<b>3 Ziele der Arbeit</b> .....	14
<b>4 Material und Methoden</b> .....	15
4.1 Versuchstiere .....	15
4.2 Anästhesie .....	15
4.3 Induktion fokaler Infarkte im sensomotorischen Vorderpfotenareal .....	16
4.4 Experimentelles Design .....	17
4.4.1 Ergänzende Versuchsgruppen zur Beurteilung der Mikrogliaaktivierung	18
4.4.2 Sensomotorisches rehabilitatives Greiftraining .....	19
4.4.3 Markierung proliferierender Zellen .....	20
4.4.4 Antiinflammatorische Therapie .....	21
4.4.5 Morris Wasserlabyrinth .....	22
4.5 Gewebepräparation .....	24
4.6 Immunhistochemie .....	25
4.6.1 Peroxidase Technik .....	25
4.6.2 Immunchemische Fluoreszenzmarkierung .....	27
4.7 Histologie .....	29
4.8 Volumetrie .....	30
4.9 Quantifizierung und Phänotypisierung der proliferierten Zellen .....	30
4.10 Statistische Analyse .....	32
<b>5 Ergebnisse</b> .....	33
5.1 Morphologie und Volumetrie der Infarkte .....	33
5.2 Auswertung des rehabilitativen Greiftrainings .....	35

5.3	Einfluss von Indometacin und Minocyclin auf die Neurogenese .....	38
5.4	Einfluss von Indometacin und Minocyclin auf residente Mikroglia .....	42
5.5	Effekte der hippocampalen Neurogenese auf die Lernleistung.....	43
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>48</b>
6.1	Physiologische Bedeutung des Immunsystems für die Neurogenese .....	49
6.2	Bedeutung postischämischer Immunreaktion für die Neurogenese .....	50
6.3	Bedeutung von Minocyclin für die postischämische Neurogenese .....	51
6.4	Bedeutung von Indometacin für die postischämische Neurogenese .....	52
6.5	Proneurogenetische Eigenschaften von Mikroglia .....	53
6.6	Erörterung der funktionellen Bedeutung der Neurogenese.....	54
6.7	Einschränkungen dieser experimentellen Studie .....	56
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen</b> .....	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>59</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>66</b>
9.1	Lebenslauf .....	66
8.2	Danksagung.....	68
8.3	Ehrenwörtliche Erklärung.....	69

*„Das Leben ist wert, gelebt zu werden, sagt die Kunst, die schönste Verführerin; das Leben ist wert, erkannt zu werden, sagt die Wissenschaft.“*

Friedrich Nietzsche

für meinen Jörg, Mathilde und Arne.

# 1 Zusammenfassung

In dieser experimentellen Untersuchung wurden die Auswirkungen von Indometacin und Minocyclin auf die trainingsinduzierte Neurogenese nach fokalen, kortikalen Hirninfarkten untersucht. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Hirninfarktmodells an Ratten durchgeführt. Ziel der Arbeit war die Überprüfung der folgenden Hypothesen: Als erstes wurde geprüft, ob sich die trainingsinduzierte Neurogenese nach einem ischämischen Hirninfarkt durch eine Behandlung mit Indometacin oder Minocyclin weiter steigern lässt. Als zweite Hypothese wurde untersucht, ob die postischämisch gesteigerte, hippocampale Neurogenese einen Einfluss auf die funktionelle Lernleistung der Ratten hat.

Insgesamt wurden 44 Tiere mit photothrombotisch ausgelösten kortikalen Infarkten in vier Experimentalgruppen eingeteilt. Drei Gruppen wurden täglich in einer Plexiglasbox im Greifen mit der betroffenen Pfote trainiert, wobei sich die Gruppen, trotz unterschiedlicher Medikation, im Greiferfolg nicht wesentlich unterschieden. Eine Gruppe mit Greiftraining wurde in den ersten zwei Wochen nach dem Infarkt mit dem unselektiven COX-Inhibitor Indometacin behandelt, eine zweite Gruppe mit Greiftraining erhielt im gleichen Zeitabschnitt das Tetrazyklinderivat Minocyclin. Einer dritten Gruppe mit Greiftraining wurde Kochsalzlösung injiziert.

Die vierte Gruppe erhielt im Vergleich zu den anderen kein rehabilitatives Greiftraining und wurde ausschließlich mit Kochsalzlösung behandelt.

Vom zweiten bis zum sechsten postoperativen Tag wurde allen Tieren zur späteren Identifikation von Zellen, die in diesem Zeitraum neu gebildet wurden, der Proliferationsmarker Bromodesoxyuridin (BrdU) intraperitoneal injiziert. Nach einem Versuchszeitraum von 42 Tagen wurden das Hirngewebe immunhistochemisch aufgearbeitet und in mehreren Schritten gefärbt und bewertet, wobei der Fokus auf der hippocampalen Hirnregion lag.

Zunächst wurden die Hirne bezüglich neuer Nervenzellen der Subgranulärzone des Gyrus dentatus untersucht. Bei Tieren die täglich Greiftraining erhielten und lediglich mit Kochsalzlösung behandelt wurden, zeigte sich schon ein signifikanter Anstieg der neuen Nervenzellen (NeuN und BrdU positiv) im Vergleich zu den Tieren der

Kontrollgruppe (kein Greiftraining, Kochsalzlösung als Injektion). Ein zusätzlicher Anstieg der neuen Nervenzellen konnte bei beiden Gruppen beobachtet werden, deren Tiere entzündungshemmende Injektionen erhielten. Zwischen den beiden Gruppen mit Minocyclin oder Indometacin- Behandlung konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Somit wurde die erste Hypothese bestätigt. Die trainingsinduzierte Neubildung der Nervenzellen kann zusätzlich durch die Gabe von entzündungshemmenden Medikamenten erhöht werden.

Von beiden verabreichten Medikamenten ist bekannt, dass sie die inflammatorische, postischämische Immunreaktion über unterschiedliche Signalwege hemmen. Um die Reduktion der mikroglialen Aktivierung zu überprüfen, wurden 14 Tage nach Infarkt Iba1 (zytochemischer Antikörper für residente Mikrogliazellen) und ED1 (zytochemischer Antikörper für aktivierte Mikrogliazellen) positive Mikroglia angefärbt. Anhand der ED1 Immunzellchemie konnten zahlreiche aktivierte Mikroglia in der Infarktumgebung dargestellt werden, allerdings keine reaktiven Mikroglia im Gyrus dentatus. Mittels Iba1 konnten zahlreiche residente Mikroglia im Gyrus dentatus angefärbt werden, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Um die funktionelle Bedeutung dieser Befunde beurteilen zu können, wurden kognitive Verhaltenstests im Wasserlabyrinth nach Morris durchgeführt. Am Ende der Versuchsperiode wurde über sieben Tage eine Lernkurve für das räumliche Orientierungsverhalten ermittelt, welche einen geringgradig besseren Lernerfolg der Greiftrainingsgruppe mit Indometacin-Behandlung im Vergleich zu der untrainierten Kontrollgruppe zeigte. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Kombination von Pharmakotherapie und Training ein tendenziell besseres funktionelles Outcome aus der Steigerung der Neurogenese geschöpft werden kann. Dieser unerwartet geringe Effekt auf die Lernleistung eröffnet ein weites Feld für zukünftige wissenschaftliche Untersuchungen. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse bereitet neue therapeutische Ansätze für die Rehabilitation von Patienten mit Schlaganfällen oder neurologischen Erkrankungen mit vergleichbaren pathophysiologischen Abläufen vor.

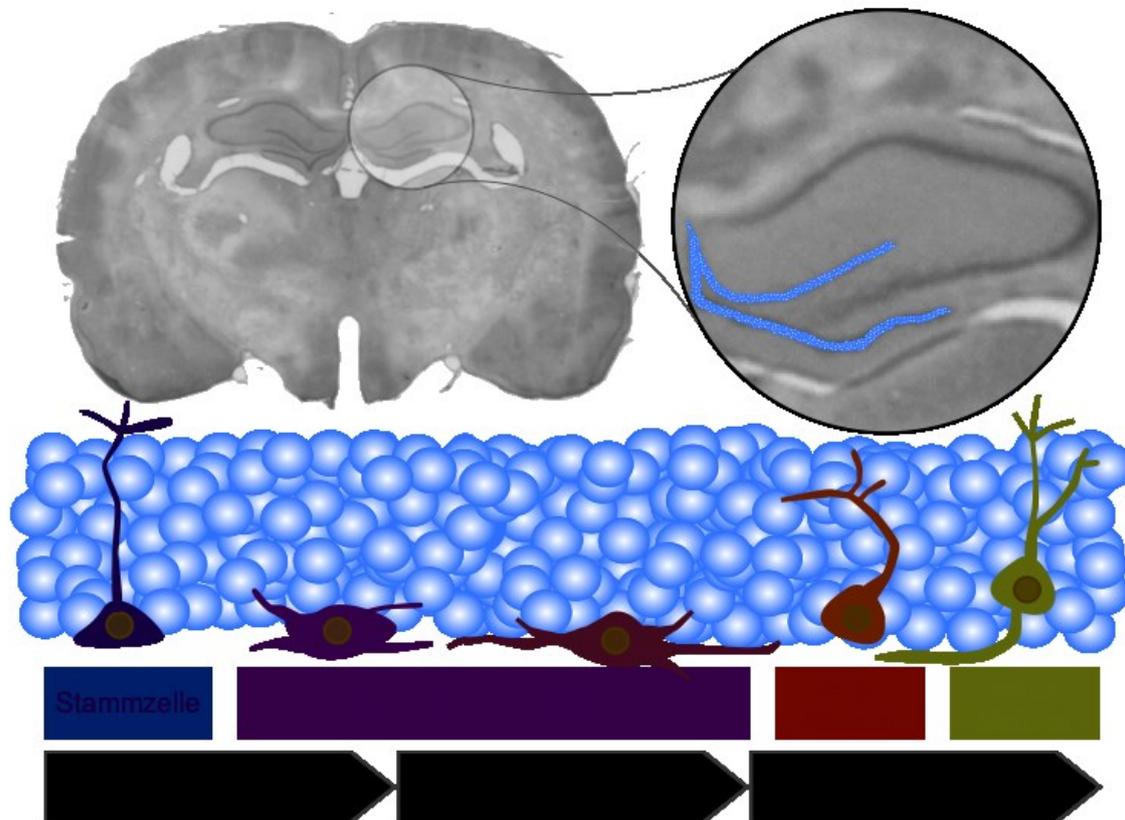
## 2 Einleitung

Plastizität bezeichnet die Fähigkeit des Gehirns, sich an ständig wechselnde Bedingungen anzupassen und sich zu reorganisieren. Plastizität wird zum einen auf der Ebene der Ausbildung neuer Kontaktstellen zwischen Nervenzellen und durch die Regulation der Anzahl an Rezeptoren ermöglicht, zum anderen durch die Bildung neuer Nervenzellen und deren Integration in das bestehende Netzwerk. Lange Zeit wurde aufgrund der Forschungsergebnisse von Santiago Ramon Cajal zum Beginn des 20. Jahrhunderts angenommen, dass Hirnzellen ab der Adoleszenz nicht mehr in der Lage sind „neu geboren zu werden“ (Cajal 1928). Dieser These wurde bereits in den sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts widersprochen (Altman und Das 1965) und das bisherige Wissen über strukturelle Plastizität grundlegend erweitert. Nachdem durch Joseph Altman die Bildung neuer Nervenzellen im Hippocampus adulter Ratten nachgewiesen wurde, konnte schließlich für den Menschen die Existenz der Neurogenese im Erwachsenenalter bestätigt werden (Eriksson et al. 1998). Durch eine Vielzahl an modernen neurowissenschaftlichen Untersuchungsmethoden konnte belegt werden, dass endogene Vorläuferzellen kontinuierlich neu generiert werden (Cameron et al. 1993). Allerdings ist im Vergleich zu anderen Organen die Anzahl der sich neu bildenden Zellen im Nervensystem gering. Die Bildung und Integration neu geborener Nervenzellen findet insbesondere in zwei Hirnregionen statt. Zum einen in der Subventrikulärzone entlang der lateralen Ventrikel und zum anderen im Gyrus dentatus der Hippocampusformation (van Praag et al. 2002).

### **2.1 Neurogenese im adulten Hippocampus**

Der Hippocampusformation gehören zwei wesentliche Strukturen an, der Gyrus dentatus und das Ammonshorn. Das Ammonshorn (Cornu ammonis) wird in seiner tangentialen Ausrichtung in vier Regionen unterteilt, CA1 bis CA4. Afferenzen gelangen über den Gyrus dentatus zum Hippocampus (Duvernoy 2005). Axone des entorhinalen Kortex erreichen unidirektional als Tractus perforans die Körnerschicht des Gyrus dentatus und werden auf die erregenden Körnerzellen verschaltet. Wie in

Abbildung 2.1 dargestellt, differenzieren in der subgranulären Zone dieser Körnerschicht endogene Stammzellen vermehrt zu neuen Nervenzellen und werden funktionell integriert (van Praag et al. 2002, Lledo et al. 2006).



*Abbildung 2.1: Darstellung des Reifungsprozesses einer neu entstehenden Nervenzelle der Subgranulärzone des Gyrus dentatus. Im oberen Abschnitt wurde eine lichtmikroskopische Aufnahme eines frontalen Hirnschnitts einer Ratte abgebildet. Eingekreist und vergrößert wurde der Hippocampus und blau markiert dessen Gyrus dentatus. In der schematischen Vergrößerung der Körnerzellschicht, wurde die Entstehung einer neuen Nervenzelle in der Subgranulärzone aufgezeigt.*

Diese funktionelle Bedeutung der adulten Neurogenese ist noch nicht vollständig verstanden. Nach aktuellem Wissensstand fungieren beim gesunden Tiermodell die neu gebildeten Neurone in der Körnerschicht der präzisen Differenzierung verschiedener neuronaler Muster („pattern separation“) (Sahay et al. 2011b), die der Wiedererkennung von externen Merkmalen bei der räumlichen Orientierung dienen (Aimone et al. 2011). Für diese hochanspruchsvolle Hirnleistung ist die

hippocampale Neurogenese wahrscheinlich auch beim erwachsenen Menschen von Bedeutung (Deng et al. 2010). Die Moosfasersynapsen zwischen den Körnerzellen und den Pyramidenzellen der CA3-Region erzeugen hochaktive Muster, welche eine Schlüsselrolle in der Gedächtniskonsolidierung spielen (Bischofberger et al. 2006). Hierfür müssen neu erworbene Gedächtnisinhalte vom Kurz- ins Langzeitgedächtnis überführt werden. Dieser komplexe Prozess wird auch als Langzeitpotenzierung bezeichnet. Wird die Neurogenese verhindert, wie durch genetische Manipulation (Knock-out Mäuse) beobachtet man in tierexperimentellen Versuchen eine Reduktion der Langzeitpotenzierung (Snyder et al. 2001). Eine generelle Verminderung der Zellteilung durch Bestrahlung oder Zytostatika bei Patienten mit Hirntumoren führt zu einer Verschlechterung der Gedächtnisleistung und räumlichen Orientierung (Greene-Schloesser und Robbins 2012). Ein ähnlicher Effekt wird für das Altern beobachtet. Im höheren Alter lässt der Anteil neu gebildeter Nervenzellen im Gyrus dentatus nach (Walter et al. 2011) bei gleichzeitiger Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten (Bishop et al. 2010). Daraus lässt sich schließen, dass junge Nervenzellen zur Langzeitpotenzierung beitragen. Neurogenese ist nicht lebensnotwendig, allerdings spielt sie eine wichtige Rolle bei der Feinregulation der hippocampalen Funktionen unter normalen Bedingungen (Sahay et al. 2011a).

### **2.2 Neurogenese und körperliche Aktivität**

Die kontinuierliche Generation neuer Nervenzellen im adulten Hippocampus wird durch die Notwendigkeit der Anpassung an neue und ungewohnte Ereignisse moduliert. Erste Studien, die eine Steigerung der Neurogenese durch erhöhte Aktivität belegen, wurden von Kempermann durchgeführt (Kempermann et al. 1997). Mäuse wurden in einem weiträumigen Käfig mit abwechslungsreichem Interieur gehalten, wobei stets ein Laufrad vorhanden war. Diese Mäuse zeigten eine höhere Anzahl neuer Nervenzellen als Mäuse, die im Standardkäfig gehalten wurden. In weiterführenden Versuchen stellte sich heraus, dass allein durch die reizreiche Umgebung, auch ohne Laufrad, die Zellteilungsrate gesteigert wird (Bednarczyk et al. 2011), woraufhin sich ein weites Feld an Möglichkeiten der funktionellen Bedeutung und der Nutzung der Neurogenese ergab. Weiterführende

Untersuchungen konnten belegen, dass diese neugeborenen Neurone erst durch wiederholte körperliche Aktivität, also durch das Laufen im Laufrad, nachhaltig am Leben erhalten werden können (Kempermann 2012, van Praag et al. 1999). Demnach führt regelmäßige körperliche Aktivität zu einer höheren Überlebensrate neugeborener Nervenzellen und deren Integration. Fehlen Mechanismen zur Integration der neuen Nervenzellen, werden diese nicht erhalten und können nicht zu funktionellen Neuronen ausreifen. Diese nicht integrierten Zellen werden schließlich wieder abgebaut (Tashiro et al. 2006). Somit lässt sich erst nach einer Latenzzeit nach der Neubildung einer Nervenzelle sicher beurteilen, ob diese funktionell in das bestehende Netzwerk integriert wurde und damit langfristig überleben kann. In der vorliegenden Studie wurde ein entsprechend langes Zeitintervall von mehreren Wochen gewählt.

In weiterführenden Untersuchungen wurde die Auswirkung von gezielt feinmotorischem Training auf die Plastizität erforscht. An gesunden Tieren konnte bisher nachgewiesen werden, dass feinmotorisches Training zu einer Induktion der Synaptogenese und zur Reorganisation neuronaler Verschaltungen im motorischen Kortex führt (Adkins et al. 2006). In einer vorangehenden Studie unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass das Greiftraining zu einer bilateralen Steigerung der Neurogenese im Hippocampus der Ratte führt. Diese Effekte auf die Neurogenese waren sogar ausgeprägter als beim Leben in einer reizreichen Umgebung (Wurm et al. 2007).

Überdies reagiert auch das erwachsene Gehirn des Menschen auf physisches Training und Umwelteinflüsse mit einer Vergrößerung des hippocampalen Volumens. In einer Übersichtsarbeit (Kramer et al. 2006) werden mehrere epidemiologische und klinische Studien vorgestellt, in denen belegt wurde, dass körperliche Aktivität zu einer Kompensation der altersbedingten Hirnvolumenabnahme, Verbesserung kognitiver Fähigkeiten und Prophylaxe degenerativer Hirnerkrankungen führt (Heyn et al. 2009, Intlekofer and Cotman 2012). Kempermann und Kollegen formulierten die Hypothese, dass der evolutionsbedingte Entwicklungsbaustein „Fortbewegung“ im Hirn als sensorisches Feedback und funktioneller Input benötigt wird, um Plastizität zu regulieren und zu adaptieren (Kempermann et al. 2010).

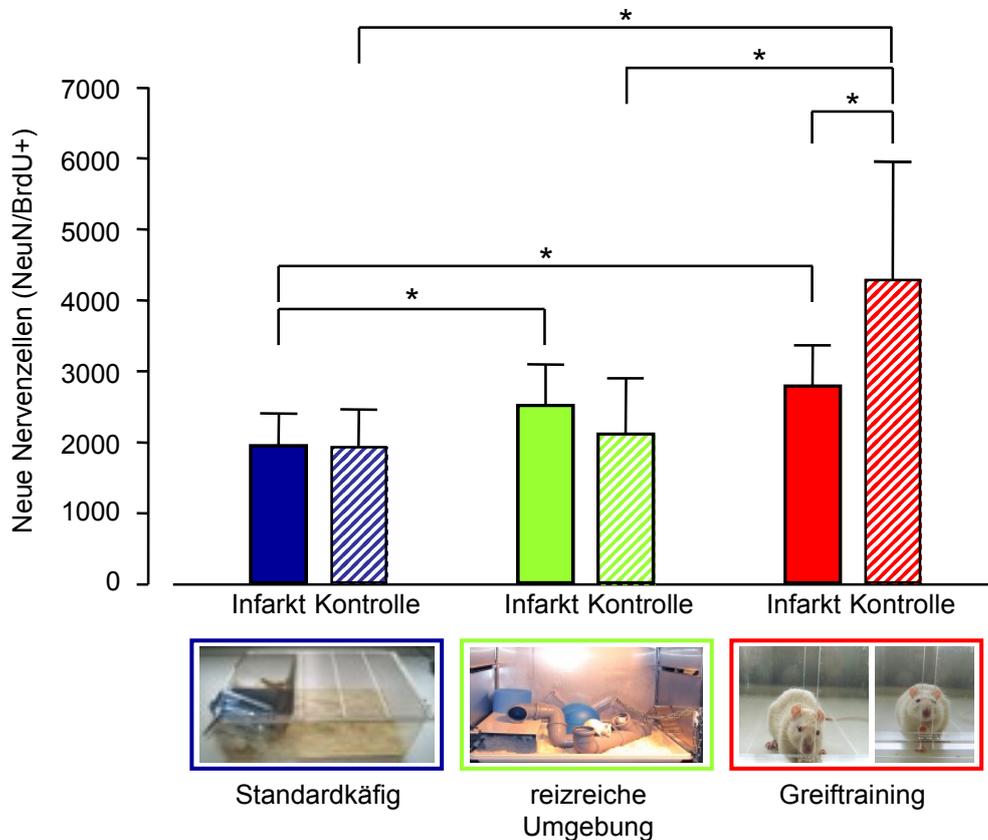
### **2.3 Neurogenese nach dem Schlaganfall**

Zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen haben in den letzten Jahren gezeigt, dass fokale Hirnläsionen zu einer verstärkten Proliferation von endogenen Stammzellen führen; dies wurde gezeigt für Schlaganfälle (Arvidsson et al. 2001, Kluska et al. 2005, Walter et al. 2010, Geibig et al. 2012, Liebigt et al. 2012), Epilepsie (Parent 2007, Parent et al. 1997) und traumatische Hirnverletzungen (Yu et al. 2008). Mit Hilfe von Ischämie-Modellen am Tier, wie dem Photothrombose-Modell, können kortikale Infarkte in spezifischen Kortexregionen ausgelöst werden (Kluska et al. 2005, Schmidt et al. 2012). Obwohl der Prozess der neuronalen Differenzierung (Abb. 2.1) mehrere Wochen benötigt, führen diese kortikalen Infarkte schon innerhalb von Stunden zu einer differenziellen Aktivierung von spezifischen, teils glialen Vorläuferzellpopulationen, die dann zu neuronalen Progenitorzellen weiter differenzieren (Abrous et al. 2005, Kunze et al. 2006). Die Mechanismen dieser Stammzellaktivierung sind weitgehend unklar. Die funktionelle Bedeutung dieser massiven, läsionsinduzierten Neuroneogenese im Hippocampus wird kontrovers diskutiert (Laplagne et al. 2006). Einerseits wurde belegt, dass diese neuen Nervenzellen nach zerebralen Infarkten in das hippocampale Netzwerk funktionell integriert werden und zu besseren Leistungen in kognitiven Verhaltenstests führen (Raber et al. 2004, Geibig et al. 2012). Andererseits zeigen aktuelle Studien, dass eine signifikante Anzahl dieser neuen Nervenzellen nach Schlaganfällen aberrante dendritische Verbindungen eingeht, welche die hippocampalen Funktionen beeinträchtigen (Niv et al. 2012). Eindeutige Zusammenhänge zwischen Neurogenese und besseren Leistungen in kognitiven Tests zeigen sich nur bei rehabilitativem Training im Anschluss an die Hirnläsion (Luo et al. 2007, Wurm et al. 2007, Geibig et al. 2012). Demnach können neu gebildete Nervenzellen unter bestimmten Voraussetzungen einen Beitrag zur postläsionellen Plastizität leisten.

Nach einem experimentellen Schlaganfall kann mit Hilfe von Rehabilitationstraining eine höhere Stimulation der Neurogenese im Gyrus dentatus der Ratte erreicht werden. Dabei wurden multiple Möglichkeiten untersucht die Anzahl neuer Nervenzellen nach einem Schlaganfall durch Aktivität weiter zu fördern. Beispielsweise wurde den Tieren ein reizreicher, weiträumiger Lebensraum

angeboten (Wurm et al. 2007) oder täglich der Zugang zum Laufrad ermöglicht (Luo et al. 2007).

In einer vorangehenden Studie unserer Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen (Abb. 2.2), dass sich das Ausmaß der Neurogenese nach kortikalen Infarkten sowohl durch eine reizreiche Umgebung als auch durch gezieltes sensomotorisches Training der betroffenen Vorderpfote steigern lässt (Wurm et al. 2007). Ein sensomotorisches Training der Ratten wurde dabei mit Hilfe einer speziellen Plexiglas-Greifbox erzielt, in der die Tiere nach dem Infarkt über ein Zeitintervall von 6 Wochen täglich 100 Futter- Pellets greifen mussten (Dauer: 5 – 10 min).



modifiziert nach Wurm et al., 2007

Abbildung 2.2: Daten aus der Vorstudie (Wurm et al., 2007) stellen die Anzahl neuer Nervenzellen in der Subgranulärzone des Gyrus dentatus unter verschiedenen Bedingungen 6 Wochen nach der operativen Hirnläsion grafisch dar. Der jeweilige Vergleich findet zwischen Tieren mit photothrombotischem Infarkt (Infarkt= gefüllte Säule) und Tieren mit Scheinoperation statt (Kontrolle= schraffierte Säule).

Kognitive Verhaltenstests zeigten gegen Ende der experimentellen Untersuchungen eine signifikante Korrelation einer gesteigerten Neurogenese mit besseren hippocampalen Leistungen. Interessanterweise wurde bei scheinoperierten Kontrolltieren, die tägliches Greiftraining erhielten, eine noch größere Anzahl neuer Nervenzellen gezählt, als bei den gleich behandelten Tieren mit kortikalen Infarkten. Diese Befunde zeigen zum einen, dass tägliches Greiftraining die hippocampale Neurogenese stimuliert, zum anderen weisen sie darauf hin, dass kortikale Infarkte die physiologische neurogenetische Plastizität im Gyrus dentatus beeinträchtigen können (Wurm et al. 2007) (Abb. 2.2).

Welche Einflüsse dazu beitragen, dass nach einem Infarkt das Plastizitätspotential reduziert ist, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass die Neurogenese nach einem Schlaganfall durch umgehend einsetzende entzündliche Prozesse beeinträchtigt werden kann (Offner et al. 2005). Aktuelle Studien versuchen die Bedeutung der postischämischen Inflammation zu beleuchten (Ekdahl 2012). In der hier vorliegenden Untersuchung wird deshalb der Frage nachgegangen, ob die Neurogenese und das funktionelle Outcome durch eine antiinflammatorische Behandlung nach Schlaganfall verbessert werden können.

### **2.4 Postläsionelle Inflammation und Neurogenese**

Jede strukturelle Hirnschädigung führt zu einer Kaskade immunmodulatorischer Prozesse, die eine Schlüsselrolle bei der sekundären Gewebeschädigung spielen. Nach einem ischämischen Schlaganfall kommt es zu einer Aktivierung hirneigener Immunzellen (Mikroglia) und zur Rekrutierung hämatogener Leukozyten (Offner et al. 2005). Ein Prozess gegenseitiger Aktivierung wird mit Hilfe von Chemokinen aufrecht erhalten, wobei im wesentlichen Tumornekrosefaktor (TNF) sowie Interleukin 1 und 6 (IL-1,-6) beteiligt sind (Abb. 2.3). Lokale Mikroglia werden zum Teil in ihre aktive Form transformiert und migrieren in das geschädigte Gewebe. Die wichtigste Kompetenz der aktivierten Mikroglia ist die Phagozytose, wobei schädigendes oder geschädigtes Zellmaterial abgebaut wird (Neumann 2006). Durch die Ausschüttung von Chemokinen, reaktiven Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid wird die Blut-Hirnschranke beeinträchtigt, so dass periphere Immunzellen einwandern können

(Ekdahl 2012). Dieses hochreaktive Milieu führt möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der reaktiv einsetzenden Neurogenese.

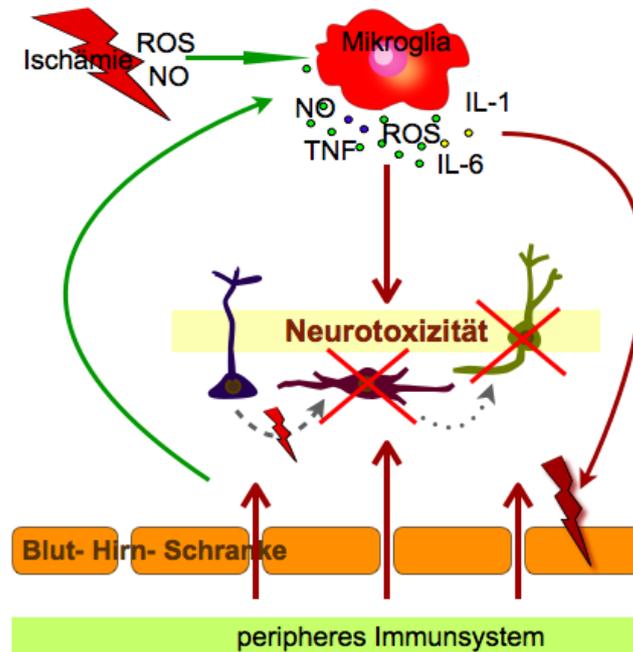


Abbildung 2.3: Die Interaktion zwischen apoptotischen Zellen, Mikroglia, peripherem Immunsystem und Neurogenese ist schematisch dargestellt. Die Abkürzungen stehen für Sauerstoffradikale (ROS), Stickstoffmonoxid (NO), Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin 1 und 6 (IL-1,-6).

Wie für den ischämischen Hirninfarkt beschrieben (siehe oben), so zeigt sich auch in der experimentellen Anwendung am Photothrombosemodell, dass es in den ersten Tagen nach einem kortikalen Infarkt zu einer diffusen Mikrogliaaktivierung im Kortex der gesamten ipsilateralen Hemisphäre, einschließlich der Hippocampusformation, kommt (Stoll et al. 1998, Schroeter et al. 1999). Es ist darüber hinaus bekannt, dass diese generalisierte Immunreaktion die Proliferation und neuronale Differenzierung der Vorläuferzellen in der Subgranulärzone stört (Monje et al. 2003); in dieser Studie konnte beobachtet werden, dass durch entzündliche Prozesse die Neurogenese im Gyrus dentatus reduziert und mit Hilfe von Indometacin wieder gesteigert wurde. Auch weitere Schlaganfallstudien zeigen eine Steigerung der postischämischen Neurogenese durch antiinflammatorische Medikamente (Hoehn et al. 2005, Kluska et al. 2005, Liu et al. 2007).

In aktuellen Untersuchungen wurde beobachtet, dass die Mikroglia nicht nur wesentlichen Einfluss auf den Verlauf inflammatorischer Prozesse nehmen, sondern auch Kontakt zu Synapsen aufnehmen, um diese zu modulieren und zu bahnen (Wake et al. 2012). Im Moment geht man davon aus, dass Mikroglia eine doppelte Funktion nach Schlaganfall haben, zum einen können sie durch die frühe Vermittlung einer generalisierten Entzündung die Neurogenese beeinträchtigen und zum anderen fördern sie die Reifung der neuen Nervenzellen in der rehabilitativen Phase (Ekdahl et al. 2009, Wolf et al. 2009).

Ziel der vorliegenden Studie war es, die frühe postischämische Inflammation pharmakologisch zu reduzieren, um im Anschluss die Anzahl neuer Nervenzellen in Korrelation zur funktionellen Leistung zu beurteilen.

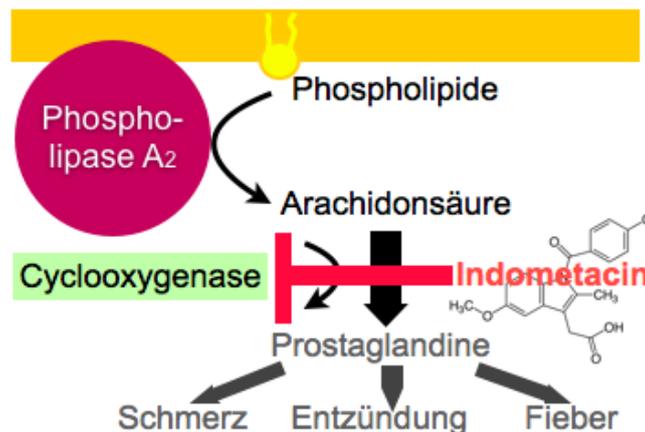


Abbildung 2.4: Dargestellt ist ein Teil des Signalweges, auf dem das Medikament Indometacin seine Wirkung vermittelt, dabei wird die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandin durch die Hemmung der Cyclooxygenase verhindert

Zur Inhibition der inflammatorischen Kaskade wurde in dieser Studie das Medikament Indometacin verwendet. Bei dem Analgetikum aus der Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika ist vor allem die pharmakologische Wirkung der nicht-selektiven Cyclooxygenasehemmung für die zerebrale Entzündungshemmung interessant, wie in Abbildung 2.4 dargestellt. Sie führt zu einer verminderten

Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine. Prostaglandine vermitteln ischämische Entzündungsreaktionen, Schmerzen und Fieber (Botting 2006). Außerdem wird die Entstehung von Leukotrienen behindert, welche bei allergischen und entzündlichen Reaktionen eine wichtige Vermittlerrolle spielen.

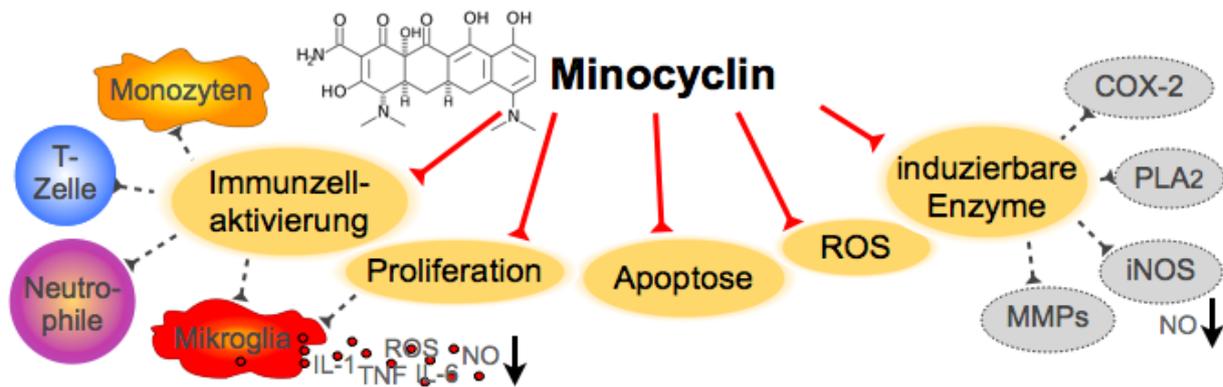


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des immunmodulatorischen Wirkanteils des Medikaments Minocyclin.

Weiterhin wurde durch die Applikation von Minocyclin die Aktivierung der Mikroglia spezifisch unterbunden (Abb. 2.5). Neben der antibiotischen Wirkung reduziert Minocyclin die Proliferation und Aktivierung residenter Mikrogliazellen durch die Inhibition von Serin/Threoninkinasen und verhindert damit ebenfalls die Freisetzung inflammatorischer Zytokine (Takahashi et al. 1992, Kim and Suh 2009, Kuhn et al. 1996), (Mullen et al. 1992, Matsukawa et al. 2009, Magavi et al. 2000). Eine weitere Eigenschaft ist die signifikante Reduktion der COX-2-Expression. Nach den Ergebnissen einer experimentellen in-vitro Untersuchung beeinträchtigt Minocyclin die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) und unterbindet die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (Kim et al. 2004), wodurch Neurone in ihrer Entstehung beschädigt werden können. Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) induziert Inflammations- vermittelnde Transkriptionsfaktoren und wird ebenfalls durch Minocyclin blockiert. In einem Tierversuch konnte gezeigt werden, dass MMP-9 durch Minocyclin inhibiert wird. Daraufhin verringerte sich die Einwanderung von T-Lymphozyten aus der Peripherie. In Mäusen mit Autoimmun-Enzephalitis konnten Entzündungszeichen durch die Injektion von Minocyclin minimiert werden (Brundula

et al. 2002). In einem experimentellen Photothrombosemodell konnte die Mikrogliaaktivierung mit Hilfe von Indometacin und Minocyclin in der Infarktumgebung signifikant reduziert werden (Liebigt et al. 2012).

Erste klinische Studien beschreiben, dass Patienten, die nach einem Schlaganfall für fünf Tage mit oral verabreichtem Minocyclin behandelt wurden, signifikant geringere Schlaganfallfolgen aufwiesen (gemessen mit der National Institutes of Health Stroke Scale) und nach 90 Tagen eine signifikant höhere Selbstständigkeit erreichten (gemäß Barthel Index) als Patienten mit Plazebothherapie (Bishop et al. 2010).

Neurogenese und rehabilitative Erfolge nach Schlaganfall können über zwei Ansätze gesteigert werden. Zum einen durch gezieltes Training der beeinträchtigten Funktion und zum anderen durch antiinflammatorische Medikation. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Ansätze darauf untersucht, wie sie einzeln und in Kombination das Outcome nach sechs Wochen beeinflussen.

### **3 Ziele der Arbeit**

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit war die Beantwortung der folgenden Fragen:

1. Lässt sich durch eine antiinflammatorische Behandlung mit Indometacin oder Minocyclin die trainingsinduzierte Neurogenese nach Schlaganfällen weiter steigern?

Um die weitere Erhöhung der Neurogenese als Rehabilitationspotential nach einem Schlaganfall auszuschöpfen, erhielten die Tiere zusätzlich zum täglichen Training über zwei Wochen eine antiinflammatorische Medikation. Die Anzahl der neugebildeten Nervenzellen wurde erst nach sechs Wochen ermittelt; durch diesen relativ langen Erholungszeitraum wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass in dieser Untersuchung nur die überlebendsten, vermutlich integrierten und wahrscheinlich funktionell bedeutsamen neuen Neurone beurteilt werden.

2. Welchen Einfluss hat diese gesteigerte Neurogenese (aus Fragestellung 1) auf Hippocampus-abhängige funktionelle Leistungen von Ratten?

Um die funktionelle Bedeutung dieser postläsionellen Neurogenese zu prüfen, wurde in der letzten Woche des Untersuchungszeitraumes ein Verhaltenstest durchgeführt, der Aussagen über die kognitive Leistungsfähigkeit der Ratten erlaubte.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Versuchstiere**

Alle vorliegenden Experimente wurden an adulten männlichen Wistar Ratten (n= 44) mit Genehmigung durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Dezernat Tierschutz, durchgeführt. Die Tiere wurden mit einem Alter von 12 bis 15 Wochen und einem Körpergewicht von 260 bis 400 g aus dem Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena übernommen. Die standardisierten Haltungsbedingungen im Verlauf der gesamten Überlebenszeit bestanden aus einer konstanten, spezifisch keimfreien Umgebung, einer Raumtemperatur von 22 bis 24 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 bis 80 % und einer Tagzeit sowie Nachtruhe von je 12 Stunden. Bis zur Übernahme der Versuchstiere hatten die Tiere freien Futterzugang und ab diesem Zeitpunkt kontrolliert restriktiv unter täglicher Gewichtsbestimmung und Zufütterung von Pellets im Rahmen der Verhaltensexperimente.

### **4.2 Anästhesie**

Für intraperitoneale Injektionen sowie zur Induktion der Photothrombose wurden die Tiere mit einer Kombinationsnarkose bis zum Tiefschlaf anästhesiert. Hierzu wurden die wachen Tiere in einen Glaszylinder gesetzt, in welchen durch einen Schlauch ein Gasgemisch aus 3,5 % Isofluran, 20 % Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und 40 % Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O) für zwei bis drei Minuten eingeleitet wurde.

Zur Applikation pharmakologischer Substanzen wurde den Tieren im Tiefschlaf eine peritoneale Injektion verabreicht. Bis zum Erwachen fand eine Überwachung im Standardkäfig statt.

Für die Induktion der Photothrombose folgte eine Fortführung der Vollnarkose über eine Inhalationsmaske, wobei der Anteil des Isoflurans auf 2,5 % gesenkt wurde. Während der operativen Eingriffe wurde die Körpertemperatur mittels einer rektalen

Temperatursonde überwacht und über eine Wärmeplatte konstant auf 37 °C reguliert. Nach Eingriffsende wurde die Narkose mit 100 % Sauerstoff ausgeleitet.

#### **4.3 Induktion fokaler Infarkte im sensomotorischen Vorderpfotenareal**

Fokale Hirninfarkte können nach dem Modell von Watson (Watson et al. 1988) in spezifischen kortikalen Hirnregionen induziert werden. Für die durchgeführten Experimente wurde eine modifizierte Variante dieser Technik eingesetzt, wie es schon bei vorangehenden Studien gezeigt wurde (Redecker et al. 2002, Wurm et al. 2007).

Im Detail wurde wie folgt verfahren. Am Vortag des operativen Eingriffs wurde die Händigkeitspote des Tieres bestimmt. Dies gelang durch Verhaltensbeobachtung des Tieres beim Greifen von Futterpellets durch einen schmalen Spalt einer Plexiglasbox.

Am Tag des operativen Eingriffs wurde den narkotisierten Versuchstieren in Rückenlage die linke Leistenregion rasiert, desinfiziert und via Hautschnitt die linke Femoralvene freipräpariert. Mit Hilfe von Fäden konnte die Vene fixiert werden, wobei der distale Abschnitt unterbunden wurde. Ein 3 cm langer Polyethylenkatheter (Ø 0,61 mm) wurde über eine subtile Inzision in die Vene eingeführt, vorgeschoben und fixiert. Die weiteren Schritte erfolgten in Bauchlage wobei der Rattenschädel durch ein stereotaktisches Gerüst fest eingestellt wurde (Abb. 4.1). Nach Inzision der Kopfhaut wurde die Kalotte lateral, entsprechend der gekreuzten Händigkeit freipräpariert und das Bregma aufgesucht. Ausgehend von dieser Kalottenmarke wurde die kortikale somatosensorische Repräsentation des Vorderpfotenareals bestimmt. Die exakten Koordinaten entstammten dem Rattenhirnatlas von Zilles (Zilles, 2012) und wurden stereotaktisch ausgemessen (Koordinaten, ausgehend vom Bregma: 2,5 mm rostral und 2,0 mm lateral). Anschließend wurde an eine Kaltlichtquelle (Schott KL 1500, Jena) über einen Lichtleiter eine Blende mit einer Öffnung von 3 x 3 mm<sup>2</sup> angeschlossen und zentral über den markierten somatosensorischen Vorderpfotenbereich aufgesetzt. Mit Aktivierung der Kaltlichtquelle wurde der photosensitive Farbstoff Bengalrosa (1% Dinatriumsalz des

3,4,5,6,-Tetrachloro-2',4',5',7'-tetrajodofluorescein in 0,9% Natriumchloridlösung) über den Venenkatheter appliziert, wobei die Endkonzentration 1,3 mg pro 100 mg Körpergewicht betrug. In der 20 minütigen Beleuchtungszeit führte die photochemische Reaktion zu einer Freisetzung von Sauerstoffradikalen, welche mit dem Gefäßendothel toxisch reagierten und zu einem thrombotischen ischämischen Hirninfarkt in der beleuchteten Region führten. Nach der Belichtung konnten die Kopfhaut sowie der Leistenschnitt vernäht werden, die Narkose wurde ausgeleitet und es schloss sich eine Beobachtungszeit im Standardkäfig zur Überwachung der Vitalität an.

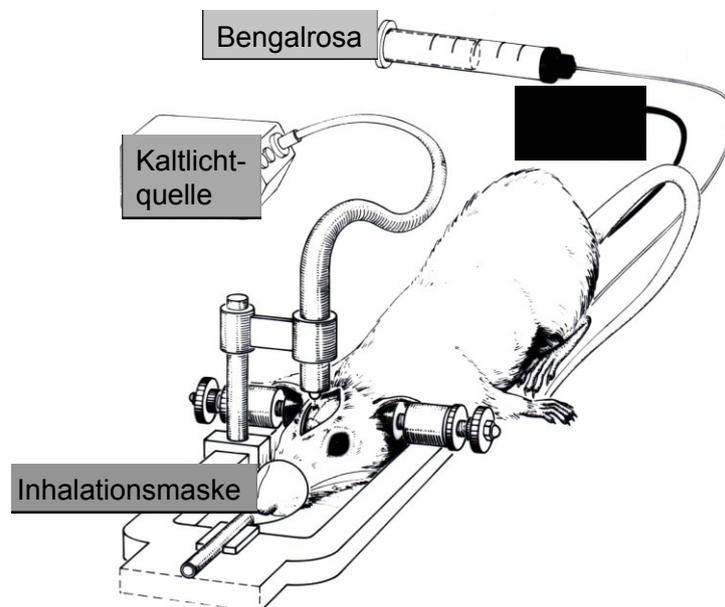


Abbildung 4.1: Arbeitsplatz während der Photothrombose. Die Ratte ist in Bauchlage auf der Arbeitsfläche stereotaktisch fixiert. Die Narkose wird durch die nasale Inhalation eines Gasgemischs aufrecht erhalten. Vitalparameter werden mit Hilfe einer Temperatursonde und der Kontrolle von Puls und Atmung überwacht. (modifizierte Abbildung; mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. M. Knieling)

#### 4.4 Experimentelles Design

Die Tiere wurden randomisiert in vier verschiedene Versuchsgruppen eingeteilt. Drei dieser vier Gruppen erhielten tägliches Greiftraining in einer Plexiglasbox. Die Tiere

nahmen an mehreren Verhaltenstests teil und wurden 42 Tage postoperativ transkardial perfundiert (Abb. 4.2).

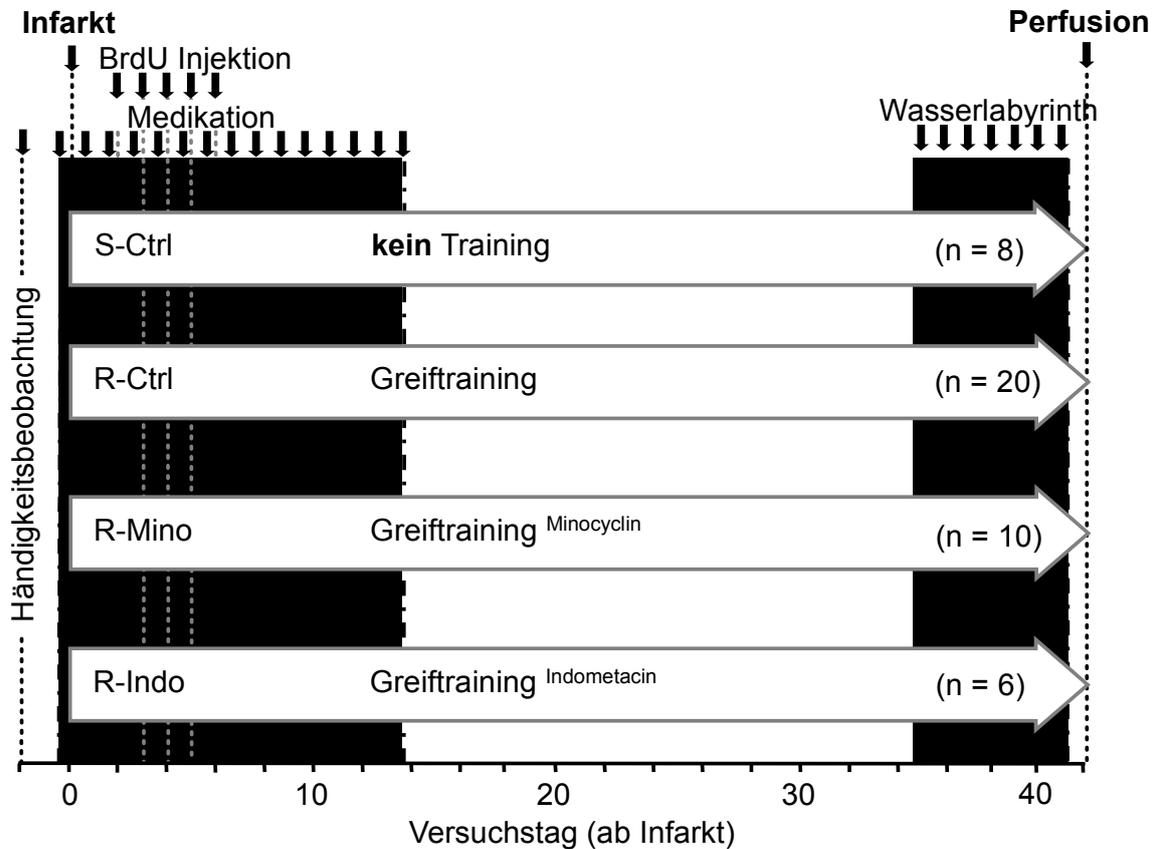


Abbildung 4.2: Schematische Abbildung des experimentellen Designs. Anhand des Zeitstrahls lässt sich nachverfolgen welche Behandlung den jeweiligen Versuchsgruppen zuteil wurde. Versuchsgruppen mit ‚R‘ erhielten Greiftraining und in Kombination Indometacin (R-Indo), Minocyclin (R-Mino) oder Kochsalzlösung (R-Ctrl) als zweimal tägliche Pharmakotherapie über 14 Tage. Die Kontrollgruppe (S-Ctrl) erhielt ausschließlich Kochsalzinjektionen.

#### 4.4.1 Ergänzende Versuchsgruppen zur Beurteilung der Mikrogliaaktivierung

Um die Auswirkung der antiinflammatorischen Medikation ausreichend beurteilen und die Aktivität der Mikroglia als Folge der Ischämie-bedingten Inflammation nachweisen zu können, wurden drei kleine Gruppen ergänzt (Abb. 4.3). Bei der Untersuchung der mikroglialen Aktivität 42 Tage nach dem ischämischen Schlaganfall, ist davon auszugehen, dass entzündliche Prozesse und die mikrogliale Aktivität zu einem großen Teil abgeklungen sind. Schon 14 Tage postoperativ

perfundiert und immunchemisch aufgearbeitet wurden. In drei Gruppen wurden jeweils 4 Tiere mit rehabilitativen Greiftraining und Minocyclin (R-Mino: n= 4), Indometacin (R-Indo: n= 4) oder Natriumchloridinjektionen (S-Ctrl: n= 4) behandelt.

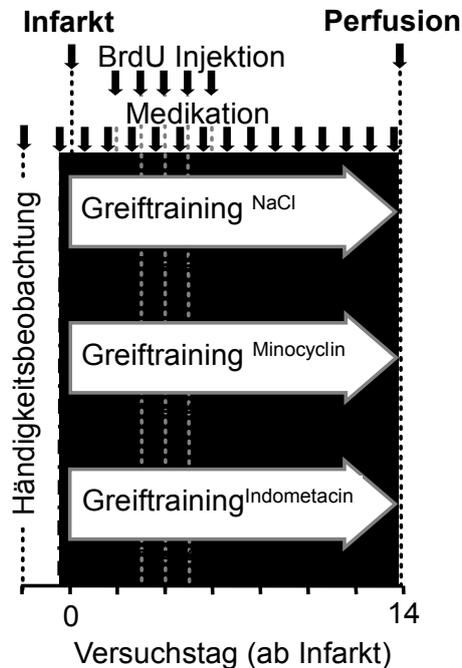


Abbildung 4.3: Ergänzung zum experimentellen Design. Anhand des Zeitstrahls lässt sich nachverfolgen welche Behandlung den jeweiligen Versuchsgruppen zuteil wurde. Die Versuchsgruppen erhielten Greiftraining und in Kombination Indometacin (R-Indo), Minocyclin (R-Mino) oder Kochsalzlösung (R-Ctrl) als zweimal tägliche Pharmakotherapie über 14 Tage.

#### 4.4.2 Sensomotorisches rehabilitatives Greiftraining

Um die Motivation für das Greiftraining zu erhalten, wurden die Tiere sowie die begrenzte Futtermenge täglich gewogen, wobei auf eine physiologische, kontinuierliche Gewichtszunahme geachtet wurde. Die fehlende Nahrungsration konnten die Tiere durch das Vorderpfotenttraining ergänzen.

Die Tiere wurden präoperativ an die Plexiglasbox gewöhnt, die später beim Greiftraining eingesetzt wurde. In der ersten präoperativen Woche wurden die Käfige täglich in den Versuchsraum gebracht und die Tiere schrittweise an das Greifen heran geführt. Weiterhin wurden die Tiere mit dem Experimentator vertraut gemacht und konnten per Hand, vorsichtig in die Plexiglasbox gesetzt werden. Im nächsten

Schritt wurden den Tieren die Futterpellets (Dustless Precision Pellets 45 MG; BioServ) auf dem Boden der Box angeboten und schließlich wurden die kleinen Pellets auf die Ablage vor dem schmalen Spalt außerhalb der Box platziert. Noch präoperativ begannen die Tiere bereitwillig angereicherte Pellets zu greifen; so konnte die bevorzugte Händigkeitspforte ermittelt werden. Der Infarkt wurde auf der gekreuzten Seite, entsprechend der zerebralen Repräsentation des Vorderpfotenareals, ausgelöst. Ab dem dritten postoperativen Tag mussten die Tiere täglich 50 und ab der zweiten Woche 100 Futterpellets greifen, wobei dieses Training von Montag bis Freitag durchgeführt wurde. In der ersten Trainingsphase wurde zusätzlich eine Trennwand in die Box so eingebaut, dass die Tiere zum Greifen der Pellets nur die lädierte Pfote verwenden konnten. Zur Objektivierung des Greiferfolgs wurde die Zeit, die zum Greifen von 25 Pellets benötigt wurde, gemessen. Am postoperativen Tag 3, 10 und 28 wurden die Tiere beim Training gefilmt und die Greiftechnik bewertet. Eine relative Erfolgsrate konnte schließlich statistisch ermittelt werden.

Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten erst 50 dann 100 Futterpellets auf dem Boden der Plexiglasbox (ohne am Greiftraining teilzunehmen).

### **4.4.3 Markierung proliferierender Zellen**

Der Proliferationsmarker 5'Bromo-2'desoxy-Uridin (BrdU; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde 1982 als ein Thymidinanalogon von Gratzner entwickelt und kann in gelöster Form systemisch appliziert werden. Um den Einfluss von Stresshormonen auf die Zellteilung und die Endergebnisse möglichst gering zu halten, wurden die Tiere für die intraperitonealen BrdU-Injektionen in eine kurze Vollnarkose versetzt. BrdU wurde postoperativ ab Tag 2 bis Tag 6 aller 12 Stunden in den Kreislauf eingebracht (50mg/kg KG in 1 ml Natriumchloridlösung) und ab diesem Zeitpunkt in alle sich neu proliferierenden Zellen eingebaut. Das vom RNA- Nukleosid Uridin abgeleitete Thymidinanalogon BrdU wird in der Synthesephase des Zellzykluses im Überfluss angeboten und konkurriert kompetitiv mit der Pyrimidinbase Thymidin um den Einbau in die DNA und wird schließlich zu einem hohen Anteil in den Synthesestrang der neu entstehenden Zellen eingebaut. BrdU ist für etwa zwei

Stunden nach der Applikation bioverfügbar (Takahashi et al. 1992, Kuhn et al. 1996) und wird dann schnell wieder aus dem Kreislauf eliminiert. Das in die proliferierten Zellen inkorporierte, speziell veränderte Nukleosid lies sich mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden noch über einen Zeitraum von mehreren Monaten detektieren.

#### **4.4.4 Antiinflammatorische Therapie**

Zwei der drei Versuchsgruppen mit Greiftraining erhielten ab dem ersten präoperativen Tag antiinflammatorische Medikation, um den Einfluss entzündlicher Prozesse auf die Neubildung von Nervenzellen zu untersuchen. Somit erhielt eine Versuchsgruppe (R-Mino) rehabilitatives Greiftraining und Injektionen mit dem spezifischen Mikroglia-inhibitor Minocyclin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einer Konzentration von 10 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 1 ml 0,9 %iger Natriumchloridlösung (Abb. 4.4).



*Abbildung 4.4: Zweidimensionale chemische Strukturformel des Medikaments Minocyclin.*

Eine weitere Gruppe erhielt rehabilitatives Greiftraining und Injektionen des nicht-selektiven Cyclooxygenaseinhibitors Indometacin (R-Indo) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einer Konzentration von 2,5 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 1 ml 0,9 %iger Natriumchloridlösung (Abb. 4.5).



*Abbildung 4.5: Zweidimensionale Strukturformel des Medikaments Indometacin.*

Die beiden verbleibenden Versuchsgruppen, eine Gruppe mit Greiftraining (R-Ctrl) und eine Versuchsgruppe ohne Greiftraining (S-Ctrl), erhielten im selben Rhythmus intraperitoneale Natriumchloridinjektionen (1ml/kg KG). Die intraperitonealen Injektionen erfolgten ebenfalls in einer kurzen, wie zuvor beschriebenen, Vollnarkose im 12stündigen Rhythmus. An den postoperativen Versuchstagen 2 bis 6 fanden die Injektionen von BrdU, der antiinflammatorischen Medikation beziehungsweise der Natriumchloridlösung zweimal täglich gleichzeitig statt, wobei möglichst weit voneinander entfernte Injektionsstellen ausgewählt wurden.

#### **4.4.5 Morris Wasserlabyrinth**

Um die Langzeitauswirkung einer fokalen Ischämie und verschiedene Stadien von Rehabilitation und Neurogenese zu beurteilen, wurden die Versuchstiere im Verhaltenstest standardisiert beobachtet und verglichen. Ein Verfahren zur Testung der hippocampalen Gedächtnisleistung besteht in der Untersuchung der räumlichen Merkleistung und Orientierung. Hierfür bot sich das Morris Wasserlabyrinth (Morris Water Maze) als Untersuchungsverfahren an. Die Versuchsanordnung bestand aus einem runden Becken mit einem Durchmesser von 181 cm und einer Höhe von 60 cm. Das Wasserbecken wurde bis zu einer Höhe von 30 cm täglich, mit frischem Wasser mit einer Temperatur von 20 bis 22° Celsius, gefüllt. Das Wasserbecken wurde virtuell nach den Himmelsrichtungen in vier Quadranten aufgeteilt. Im

umgebenden Raum befanden sich externe Hinweisreize zur Autolokalisation der Ratte, wie Poster, Lampen, verdunkeltes Fenster und Tür. Im Süd-West-Quadranten des Bassins befand sich über die gesamte Akquisitionszeit eine Plattform etwa 1 bis 2 cm unter der Wasseroberfläche im gleichen grauen Farbton wie die Beckenwand. Die Tiere wurden über mehrere Tage getestet, wie schnell und zielstrebig sie diese, unter der Wasseroberfläche befindliche, nicht sichtbare Plattform auffanden und sich deren räumliche Position merkten. Die Schwimmrouten wurden mit Hilfe einer Videokamera, die über dem Schwimmbecken montiert war, aufgezeichnet. Während der Versuchsdurchführung wurde der Raum abgedunkelt und es bestanden keine lokalen Landmarken zur Orientierung sondern nur globale Reize aus der räumlichen Umgebung, wodurch vor allem das räumliche Lernverhalten des Tieres untersucht wurde. Das natürliche Fluchtverhalten der Tiere und die Belohnung durch Exit über die sichere Plattform bildeten einen hohen Motivationsfaktor. Die Tiere mussten Informationen über ihre Startlokalisierung, die Schwimmroute und die Ziellokalisierung im räumlichen Vergleich zu Orientierungspunkten im Versuchsraum (externe Reize) verarbeiten. Hierzu wurden die Ratten aller Versuchsgruppen ausgehend von vier verschiedenen Startpunkten (in randomisierter Reihenfolge Nord, Süd, Ost, West) mit dem Kopf zur Beckenwand in das Schwimmbecken eingesetzt. Bei Wiederholung wurde die Reihenfolge der Startpositionen nach Zufallsprinzip variiert. In einer täglichen Versuchsdurchführung vom postoperativen Tag 35 bis Tag 41 wurde für jedes Tier die Zeitdauer und die Wegstrecke bis zum Erreichen der Plattform aus den vier Startpositionen am Beckenrand ermittelt. Jedes Tier hatte eine maximale Zeitspanne von 90 Sekunden um die Plattform zu erreichen. Wurde in dieser Zeit die Plattform nicht aufgefunden, wurde das Tier vom Versuchsleiter für 20 Sekunden auf die Plattform gesetzt. Am Tag 42 fand zunächst eine Trainingseinheit mit dem selben Ablauf wie an den vorhergehenden Tag statt. In einem abschließenden Zusatzversuch (Probe-Trial) wurde die Plattform aus dem Bassin entfernt. Jede Ratte wurde von einer Startposition direkt gegenüber der vorherigen Zielplattform ins Becken eingesetzt. Daraufhin wurde für 60 Sekunden die relative Aufenthaltsdauer der Tiere in den verschiedenen Quadranten sowie in der Region der Zielplattform aufgezeichnet. Relevant war die Aufenthaltsdauer im richtigen Zielgebiet der Plattform ohne, dass sich die Plattform im Becken befand. Die Aufzeichnung des

Morris Wasserlabyrinth- Tests erfolgte über eine Digitalkamera (Panasonic, Super Dynamic WV GP 450) und wurde mit Hilfe der Software Ethovision (Noldus Information Technologie, Wageningen, Niederlande) digitalisiert und ausgewertet.

#### **4.5 Gewebepreparation**

Für die Aufarbeitung des Hirngewebes wurden die Tiere mit Hilfe einer Perufusionsmaschine transkardial perfundiert. Am Tag 42 postoperativ wurden die Ratten in einem verschließbaren Glaszylinder mit Hilfe von Diethylether tief anästhesiert und daraufhin in Rückenlage in einer Perfusionsschale an den Extremitäten fixiert. Nach Desinfektion wurde eine mediane Laparotomie mit einem Hautschnitt bis zum Sternum durchgeführt und dann das Sternum mit Hilfe einer chirurgischen Schere eröffnet. Nach Aufsuchen des vitalen Herzens wurden die Herzventrikel mit Klemmen fixiert und der linke Ventrikel im Bereich der Herzspitze inzidiert. Über diese Inzision konnte die Perfusionskanüle bis in die aufsteigende Aorta vorgeschoben und fixiert werden. Kurz nach dem Einschalten der Perfusionspumpe wurde das rechte Atrium eröffnet, um das Abfließen von Flüssigkeiten zu gewährleisten. Mit Hilfe der Perfusionspumpe (505S, Watson-Marlow, England) wurden die Tiere mit einer kontinuierlichen Flussgeschwindigkeit von 30 ml/min für drei Minuten mit gekühlter Phosphatgepufferter Normalsalzlösung (PBS) vom Blut entleert. Anschließend wurden 300 ml Paraformaldehyd (4 %iges PFA in 0,1 M Phosphatpuffer) perfundiert zur chemischen Fixierung des vulnerablen Gefäßendothels. Nach Beendigung der Perfusionsphase konnte das Tier dekapitiert werden.

Im nächsten Schritt fand die Präparation des Hirngewebes statt. Die Kopfhaut wurde zunächst entlang der Sagittalnaht durchtrennt. Ausgehend vom Foramen Magnum wurde dann die Okzipitalschuppe mit einer Pinzette entfernt und der Schädelknochen beidseitig in frontaler Richtung durchtrennt, bis das Schädeldach abgehoben werden konnte. Die Dura Mater wurde von der Hirnoberfläche entfernt und das Gehirn mit einem gebogenen Spatel aus der Schädelgrube gehoben, unter besonderer Rücksicht auf die Vollständigkeit und Unversehrtheit. Die ausgelösten Hirne wurden

digital fotografiert und zur weiteren chemischen Gewebefixierung in Falcon Tubes, die mit PFA (4 %) gefüllt waren, gelegt und über Nacht inkubiert.

Die Kryofixierung fand mit Hilfe von Saccharoselösung in zwei Stufen statt. Am Folgetag der Perfusion wurden die Hirne bis zu ihrem Absinken in den stehend gelagerten Tubes in 10 %ige Saccharoselösung eingebracht (maximal 24 Stunden) und daraufhin für weitere 24 bis 48 Stunden in 30 %ige Saccharoselösung, bei einer Kühlschranktemperatur von 4°C, überführt. Zur anschließenden Aufbewahrung wurden die Hirne bei einer Temperatur von -25 bis -30°C kaltem Methylbutan eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die histo- und immunhistochemischen Färbungen wurden am Gefriermikrotom in Abständen von 40 µm koronare Schnitte durch das gesamte tiefgefrorene Hirngewebe angefertigt. Die frisch geschnittenen Hirnscheiben wurden aufeinanderfolgend, frei-schwimmend („free-floating“) in Mikrotiterplatten mit Phosphat-gepufferte Normalsalzlösung überführt. Zur längeren Aufbewahrung der zunächst nicht benötigten Hirnschnittsequenzen wurden diese in Mikrotiterplatten mit Gefrierschutzlösung (Natriumazid) freischwimmend gelegt und bei -20°C aufbewahrt.

#### **4.6 Immunhistochemie**

Alle Färbetechniken des geschnittenen Hirngewebes wurden in Multiwell®-Zellkulturplatten bei frei flottierenden Hirnschnitten von 40 µm Schichtdicke vorgenommen (free-floating-Technik). Diese Technik bietet bei der Simultanfärbung mehrere Hirnschnitte den Vorteil, dass Antikörper und Seren auf eine große Oberfläche einwirken können. Zwischenschritte und Färbungen fanden bei Raumtemperatur statt, welche circa 21 bis 23° Celsius betrug. Die Einwirkzeiten der Wasch- und Inkubationsphasen fanden auf einem Horizontalschüttler statt.

##### **4.6.1 Peroxidase Technik**

Zur Quantifizierung der neu entstandenen Zellen im Hippocampus wurde, der zuvor beschriebene Proliferationsmarker BrdU immunhistochemisch angefärbt. Dabei bindet zunächst ein primärer Antikörper (rat Anti-BrdU) an die proliferierten Zellen mit

inkorporiertem BrdU und im zweiten Schritt ein sekundärer Antikörper (donkey Anti-rat IgG biotinyliert) am primären Antikörper. Der sekundäre Antikörper enthält Chromogen 3'-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB), welches durch Zugabe des Katalysators Peroxidase in einer Redoxreaktion zu einem dunkelbraunen Phenazinpolymer einfärbt.

Am ersten Tag wurde jeder sechste Schnitt der Rattenhirne dreimal beziehungsweise bei vorheriger Aufbewahrung in Gefrierschutzlösung sechsmal in TBS (Tris-gepufferte Normalsalzlösung) gewaschen und für 30 Minuten zur Aufsättigung endogener Peroxidasen in 0,6 %igem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) behandelt. Nach weiteren dreimaligen Waschen in TBS erfolgte der Zellaufschluss bei Denaturierung der nukleären DNA für 30 Minuten bei 37°C in 2 N Salzsäure (HCl). Anschließend wurden die Schnitte zehn Minuten in 0,1 M Borsäure bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals in TBS gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen verblieben die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in TBS plus (TBS plus 0,1 % Triton + 3 % Eseserum). Die Verdünnung des primären Antikörpers erfolgte ebenfalls in diesem Puffer. Die Schnitte wurden über Nacht (24 Stunden) auf einem Schüttler bei 4° Celsius im primären Antikörper (monoclonal rat anti-BrdU, 1:500, Harlan Seralab, England) mit TBS plus inkubiert.

Am zweiten Tag wurden die Gewebeschnitte mehrmalig intensiv gewaschen und dann in TBS plus 15 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation im biotinylierten Sekundärantikörper (Biotin-SP-conjugated AffiniPure donkey anti-rat IgG, 1:500, Dianova, Hamburg, Deutschland) für zwei Stunden bei Raumtemperatur, gefolgt von drei weiteren Waschsritten. Schließlich konnte das Gewebe für eine Stunde mit ABC-Reagenz (Avidin Dehydrogenase/ biotinylierte Peroxidase, Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) bei Raumtemperatur behandelt werden. Avidin des ABC- Reagenz ist ein Glykoprotein, das aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist, wovon jede Untereinheit je ein Biotinmolekül binden kann. Nach dem letztmaligen dreifachen Waschen wurde das Gewebe in TBS gelegt. An einem isolierten, geschützten Arbeitsplatz erfolgte die Zugabe des DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Wasserstoffperoxid-Lösung, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) für 12

Minuten, wodurch die Peroxidase-Reaktion gestartet wurde. Während dieser Zeit wurde DAB oxidiert und Wasserstoffperoxid reduziert. Als Redoxreaktionsfolge bildete sich ein dunkelbraunes, amorphes, in Wasser und Ethanol unlösliches Phenazinpolymer. Nach dreifachem Waschen in TBS wurden die gefärbten Schnitte in 0,5 %iger Gelatinelösung auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Im letzten Schritt der Fixierung wurden die bestückten Objektträger in Toluol (Entellan® Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt. Nach 24 Stunden Trocknungszeit konnte die quantitative Auswertung unter dem Lichtmikroskop beginnen.

Mit Hilfe der selben, eben beschriebenen Technik unter Verwendung alternativer Antikörper fand die immunhistochemische Verarbeitung zur Färbung hippocampaler Mikrogliazellen statt. Hierfür wurde als primärer Antikörper bei jedem sechsten Hirnschnitt Iba1 (Rabbit Anti-Iba1, 1:500, Wako Chemicals USA, Richmond, USA) verwendet. Das ionisierte Calcium-bindende Adaptermolekül 1 ist ein Protein, das sich als MHC-Komplex (Haupthistokompatibilitätskomplex) auf der Oberfläche teil- oder aktivierter Mikroglia als Antigen präsentiert. Als weiterer Antikörper zur Identifikation residenter Makrophagen diente ED1 (Mouse Anti-CD68 Clone ED1, 1:500, Serotec, Oxford, UK). ED1 bindet an CD68 (Cluster of Differentiation 68) Glykoproteine, welche von Makrophagen exprimiert werden. Im zweiten Schritt wurden die sekundären Antikörper, welche in den entsprechenden Tierseren hergestellt wurden, verwendet (biotinyliertes Donkey Anti-Rabbit sowie Anti-Mouse IgG, 1:500, Dianova, Hamburg, Deutschland).

#### **4.6.2 Immunchemische Fluoreszenzmarkierung**

Durch Immunfluoreszenzmarkierung konnten die BrdU-positiven Zellen in neuronale und gliale Zellen unterteilt werden. Zum einen durch die Doppelfärbung mit BrdU-Antikörper und dem neuronalen Marker NeuN („neuronal nuclei antigen“) (Mullen et al. 1992, Magavi et al. 2000) und zum anderen durch die Doppelfärbung mit BrdU-Antikörper und dem glialen Marker S100 $\beta$  (Kalzium-bindendes Protein) (Ghandour et al. 1981). Zur Phänotypisierung wurde jeder 12. Schnitt verwendet und zunächst in derselben Weise prozessiert wie im vergangenen Abschnitt für den ersten Tag beschrieben wurde. Die Blockierung endogener Peroxidasen mit Wasserstoffperoxid

entfiel. Die vorbehandelten Hirnschnitte wurden für 48 Stunden bei 4°C im primärem Antikörper inkubiert (Rat Anti-BrdU, 1:500, Harlan Seralab, England; Rabbit Anti-S100 $\beta$ , 1:2500, Swant, Bellinzona, Schweiz; Mouse Anti-NeuN 1:500, Chemicon, Temeculan USA).

Nach der Inkubationszeit wurden die Gewebeschnitte zweimal in TBS gewaschen und für 15 Minuten in TBS plus bei Raumtemperatur geblockt. Die sekundären Fluoreszenzantikörper wurden bei 4°C über Nacht lichtgeschützt inkubiert (Rhodamine Red Anti-rat, 1:250, Dianova, Hamburg Deutschland; Alexa Fluor 488 Anti-rabbit, 1:250, Molecular Probes, Leiden, Niederlande; Cy5 anti-mouse, 1:250, Dianova, Hamburg, Deutschland).

Im letzten Schritt wurden die bearbeiteten Schnitte sechsmal mit TBS gewaschen, mit 0,5 %iger Gelatine auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Zur dauerhaften Fixierung wurden die bestückten Objektträger mit Polyvinylalkohol (Mowiol®, Calbiochem) eingedeckelt. Sobald die Objektträger trocken waren, begann die Auswertung.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
<b><i>primäre Antikörper</i></b>		
Rat anti-BrdU	1:500	Oxford Biotechnology, Kidlington, UK
Mouse anti-NeuN	1:500	Chemicon, Temecula, CA, USA
Rabbit anti-S100β	1:2500	Swant, Bellinzona, Schweiz
Rabbit anti-Iba 1	1:500	Wako Chemicals, Richmond, USA
Mouse anti-CD 68 clone ED1	1:500	Serotec, Oxford, UK
<b><i>sekundäre Antikörper</i></b>		
Rhodamine-red donkey anti-rat	1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland
Alexa-488 donky anti-rabbit	1:250	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Cy5 donkey anti-mouse	1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland
Biotin-SP-conjugated donkey anti-rat IgG	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
Biotin-SP-conjugated donkey anti-rabbit IgG	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
Biotin-SP-conjugated donkey anti-mouse IgG	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland

*Tabelle 4.1: In dieser Übersicht sind alle verwendeten primären und sekundären Antikörper aufgelistet.*

#### **4.7 Histologie**

Zur volumetrischen Vermessung des Infarktolumens und des globalen Hirnvolumens wurde von jedem sechsten beziehungsweise im Infarktareal jedem vierten Schnitt eine Nissl-Färbung angefertigt (benannt nach Franz Nissl, Neurologe und Psychiater 1860-1919). Bei dieser Färbetechnik wurden mit Hilfe des basischen Oxazin-Farbstoffs Kresylviolett-Acetat die Zellkerne angefärbt. Der Farbstoff geht eine basophile Verbindung zu RNA und DNA ein, wodurch die Zellorganellen wie Nukleoli und Ribosomen blau bis violett gefärbt wurden. Die Gewebeproben wurden zuerst auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und in einer

absteigenden Alkoholreihe für ein bis fünf Minuten getaucht aus 96 % Ethanol, 80 % Ethanol und 60 % Ethanol. Nach fünf minütiger Wässerung in destilliertem Wasser erfolgte für ein bis zehn Minuten die Kresylviolett-färbung in gepufferter Lösung. Daraufhin konnten fünfminütige Spülungen in Acetatpuffer und die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 90 % Ethanol, 96 % Ethanol und Isopropanol) stattfinden. Nach der zweimaligen Inkubation für fünf Minuten in Xylol wurden die Schnitte im letzten Schritt mit Methylbenzen (Entellan® Merck, Deutschland) fixiert und eingedeckelt.

#### **4.8 Volumetrie**

Die volumetrischen Messungen wurden eingesetzt, um das Gesamthirnvolumen der Tiere sowie die Infarktgrößen bestimmen zu können.

Die Messung erfolgte an jedem achten Schnitt für das Gesamthirnvolumen und an jedem vierten Schnitt zur Bestimmung des Infarktareals. Die nach Nissl gefärbten Hirnschnitte wurden auf einem helligkeitsstabilisierenden Beleuchtungstisch (Imaging Research Inc., Model B95) aufgelegt und mit einer CCD-Kamera (Mandi YG 9220, Opto- und Spezial-Elektronik GmbH, Deutschland) aufgenommen. Das Kamerasignal wurde dann über einen Video-Prozessor (Hamamatsu, DVS-3000) nachverstärkt, digitalisiert und an einen leistungsstarken Rechner (MacIntosh IIfx) übertragen. Die Analyse der Flächendaten erfolgte mit einem kommerziellen Bildverarbeitungsprogramm (NIH USA Image Software). Dabei wurde der Infarktbereich manuell nachgezeichnet (ROI engl. „region of interest“) und die Hirnschnittfläche durch Farbkodierungen technisch ermittelt. Die Abschätzung des Läsionsvolumens und der Hirnvolumina erfolgte durch integrale Analyse der Flächeninhalte mit der Dicke und den Abständen der Schnitte (Volumen = Fläche [mm<sup>2</sup>] x Schichtdicke 0.04 [mm] x 8 bzw. 4).

#### **4.9 Quantifizierung und Phänotypisierung der proliferierten Zellen**

Die Anzahl der Zellen der Subgranulärzone des Gyrus dentatus, die den Proliferationsmarker BrdU inkorporiert hatten, wurde ermittelt. Jeder Peroxidase-

gefärbte Schnitt (jeder sechste Hirnschnitt) wurde an einem Lichtmikroskop (Zeiss Axioplan 2®) bei 20- bis 40-facher Vergrößerung ausgewertet. Ipsi- und kontralateraler Gyrus dentatus wurden getrennt ausgezählt. Zur Hochrechnung auf die Absolutmenge BrdU-positiver Zellen im kompletten ipsi- und kontralateralen Gyrus dentatus eines Tieres wurden die Zellzahlen addiert und mit 6 multipliziert.

Die Phänotypisierung der BrdU-markierten Zellen erfolgte durch die Auswertung der Mehrfachimmunfluoreszenz an einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop („LSM“; engl. *laser scanning microscope*) unter 40facher Vergrößerung (Zeiss LSM 510®, Jena, Deutschland).

Für die Fluoreszenzmikroskopie waren an die sekundären Antikörper fluoreszierende Farbstoffe angekoppelt, die durch Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge (Rhodamine Red bei 554 nm, Alexa Fluor bei 488 nm und Cy5 bei 650 nm) zur Photoemission gebracht wurden. Nacheinander wurden hierfür entsprechende Laser eingesetzt (Helium-Neon 1, Argon, Helium-Neon 2). Mit dem LSM war es möglich, den zu untersuchenden Probenschnitt in bis zu 20 Schichten zu unterteilen und dreidimensional zu analysieren (Z-Ebenen). In der technischen Bearbeitung wurden die verschiedenen Schichten aller Fluoreszenzwellenlängen übereinander gelegt, um die Zellen dreidimensional und farbstoffselektiv zu betrachten. Jeder zwölfte Schnitt wurde auf die Kollokalisierung der Fluoreszenzmarker von NeuN und S100 $\beta$  mit BrdU untersucht und eine Phänotypisierung in neuronale, gliale und nur BrdU-positive Zellen (undefinierbare neu proliferierte Zellen) vorgenommen. Dafür wurden von zufällig ausgewählten Bereichen des Gyrus dentatus alle Z-Ebenen aufgenommen und sowohl ipsi- als auch kontralateral jeweils 30 BrdU-positive Zellen der Subgranulärzone des gesamten Bildausschnitts phänotypisiert. Hieraus wurde der jeweilige prozentuale Anteil der mehrfach markierten Zellen ermittelt.

In Zusammenschau der quantitativ ermittelten Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen und der relativen Anzahl kollokalisierter Phänotypen konnten Hochrechnungen der Absolutzellzahlen pro ipsi/kontralateraler Hirnhälfte eines Tieres erfolgen.

#### **4.10 Statistische Analyse**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte der Tiere einer zusammengehörigen Gruppe zusammen mit der entsprechenden Standardabweichung (SD) oder dem Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch Datenverarbeitung mit dem Statistikprogramm SPSS® (Version 12.0). Zunächst wurden die Daten auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk geprüft. Im nächsten Schritt wurde ein Globaltest zur Evaluierung intergruppaler Signifikanzen durchgeführt. Bei einer parametrischen Datenverteilung wurde dabei die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA = Analysis Of Variance) und bei non-parametrischer Datenverteilung der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Ergaben sich aus dem Globaltest Signifikanzen ( $p < 0,05$ ), so wurde die statistische Analyse mit einem Paartest fortgesetzt. Dabei wurde bei parametrischer Datenverteilung anhand des ungepaarten T-Tests beziehungsweise bei non-parametrischer Datenverteilung anhand des Mann-Whitney- Tests geprüft. Eine Korrektur für multiple Vergleiche war angesichts der geringen Zahl der Vergleiche und des zuvor angewandten Globaltests nicht erforderlich. Der Vergleich der Resultate erfolgte zwischen allen Experimentalgruppen in der direkten Gegenüberstellung.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Morphologie und Volumetrie der Infarkte

Alle Versuchstiere (n = 44) wurden standardisiert operiert und zeigten *post mortem* gleichmäßige, begrenzte photothrombotische Läsionen in der Zielregion, dem kortikalen sensomotorischen Vorder- und Hinterpfotenareal. Alle sechs kortikalen Schichten waren in der lichtmikroskopischen Betrachtung der Kresylviolett-Hirnschnitte sichtbar von der Zellestrukturen betroffen, während die subkortikalen Schichten intakt blieben.

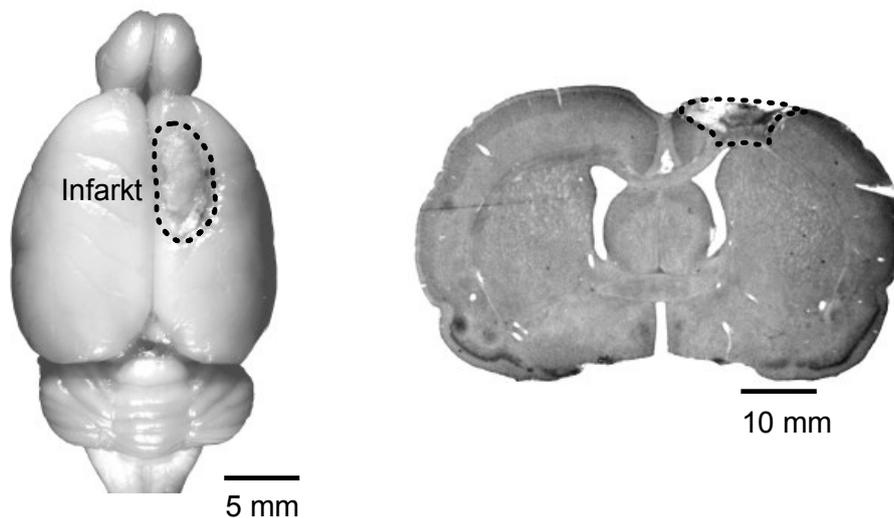


Abbildung 5.1: Abbildung des Hirninfarkts. Links ist die Aufsicht auf ein frisch präpariertes Hirn nach transkardialer Perfusion abgebildet. Im rechten Bildteil ist eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Kresylviolett-gefärbten Hirnschnitts im Bereich des Hippocampus abgebildet. Mit Hilfe einer gepunkteten Kontur sind die Infarktgebiete hervorgehoben.

Das Ausmaß des Infarktolumens wurde nach dem Ende der Versuchszeit von 42 Tagen bestimmt. Da alle Tiere der Gruppen vergleichbare operative Prozeduren erhielten, konnten Rückschlüsse über den rehabilitativen Einfluss der verschiedenen Behandlungsmethoden auf das Ausmaß des Infarktes gezogen werden.

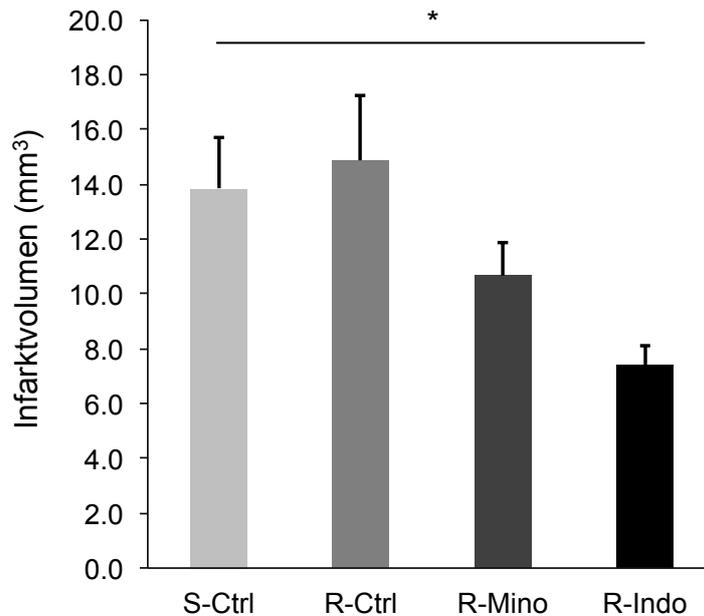


Abbildung 5.2: In dieser Grafik wurde der Mittelwert der Infarktvolumina (in [mm<sup>3</sup>] ± Standardfehler) der Tiere der einzelnen Versuchsgruppen dargestellt. Alle Gruppen mit ‚R‘ erhielten Greiftraining und Indometacinbehandlung (R-Indo: 7,4 ± 1,8 mm<sup>3</sup>), Minocyclinbehandlung (R-Mino: 10,7 ± 3,7 mm<sup>3</sup>) oder Injektionen mit Kochsalzlösung (R-Ctrl: 14,9 ± 7,9 mm<sup>3</sup>). Die Kontrollgruppe erhielt kein Training (S-Ctrl: 13,8 ± 5,4 mm<sup>3</sup>). Der Vergleich zwischen R-Indo und S-Ctrl ergab einen signifikanten Unterschied (- 50 %; p = 0,007).

In Abbildung 5.2 lies sich erkennen, dass die antiinflammatorische Behandlung zu einer Reduktion der Infarktgröße führte. Es zeigte sich, dass Tiere der Gruppe, die eine medikamentöse Therapie mit Indometacin erhalten hatten, ein um 50 % (p=0,007) geringeres Infarktvolumen aufwiesen im Vergleich zu den Tieren, die lediglich mit Kochsalzlösung behandelt wurden. Zwischen der Gruppe der Tiere mit Kochsalzinjektion und der Gruppe mit Minocyclinbehandlung zeigte sich kein signifikanter Unterschied (-28,2 %).

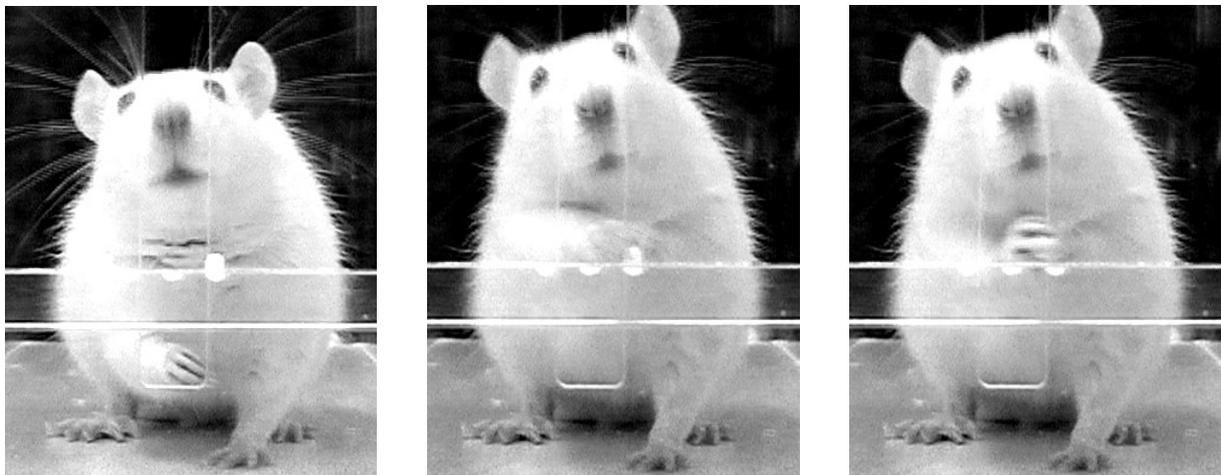
Zusammenfassend lässt sich beschreiben, dass eine Kombinationstherapie aus Greiftraining und antiinflammatorischer Behandlung zu einer signifikanten Reduktion des Infarktausmaßes und damit des quantitativen Hirnschadens führt.

Die Analyse des globalen Hirnvolumens ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen. Der Mittelwert aller Hirnvolumina betrug 930 mm<sup>3</sup> (± 11,7 mm<sup>3</sup>), dabei schwankten die Mittelwerte der

Versuchsgruppen zwischen 865 mm<sup>3</sup> und 997 mm<sup>3</sup>. Die Daten wurden nicht dargestellt.

## 5.2 Auswertung des rehabilitativen Greiftrainings

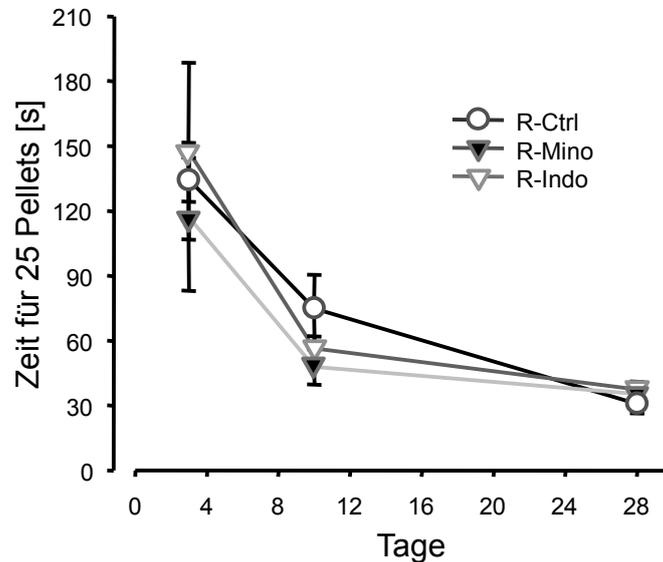
Drei Tage nach der Induktion des Infarkts wurde mit dem rehabilitativen Greiftraining begonnen (Abb. 5.3). Wie schon in einer vorhergehenden Studie gezeigt wurde (Wurm et al., 2007), erholten sich die Tiere zügig von dem Eingriff und verbesserten ihre Greiftechnik in wenigen Wochen.



*Abbildung 5.3: In dieser videogestützten Studie wurde der Greifvorgang abgebildet. Die Ratte lokalisierte zunächst das Objekt, streckte zielstrebig die Pfote zum Pellet und umgriff schließlich vollständig mit allen Zehen ihr Futterstück.*

Zur Beurteilung der Erholung der geschädigten Funktion der Vorderpfote wurde an den postoperativen Tagen 3, 10 und 28 eine videogestützte Analyse des Greiftrainings durchgeführt. Es wurden zwei Parameter beurteilt, ein quantitativer und ein qualitativer. Gemessen wurde das Zeitintervall, dass ein Tier benötigte, um 25 Pellets zu greifen und zu verzehren (Abb. 5.3). Drei Tage postoperativ benötigten die Tiere noch wesentlich mehr Zeit um 25 Pellets zu Greifen, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen zeigten. 28 Tage postoperativ benötigten die Tiere für das Greifen der selben Anzahl an Pellets nur

noch ein Viertel der Zeit. Auch für die Ausführung des Greifvorgangs konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ermittelt werden (Abb. 5.4).



*Abbildung 5.4: Verbesserung der Greifgeschwindigkeit für 25 Pellets bis Tag 28 postoperativ. An den Versuchstagen 3, 10 und 28 wurde die Zeit (Intervall um 25 Pellets nacheinander zu greifen und zu fressen) gemessen. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere.*

Im Detail konnten die folgenden Zeiten gemessen und statistisch verglichen werden (Abb. 5.4). Am dritten postoperativen Tag benötigten Tiere der Kontrollgruppe (R-Ctrl) 135 Sekunden ( $\pm 32$  s), die Versuchsgruppe mit Minocyclinthherapie (R-Mino) 117 Sekunden ( $\pm 108$  s) und die verbleibende Gruppe mit Indometacintherapie (R-Indo) 148 Sekunden ( $\pm 108$  s). Es zeigte sich, dass die Ergebnisse kurz nach dem Eingriff sehr heterogen ausfielen. Schon am zehnten postoperativen Tag benötigten die Tiere nur etwa die Hälfte der Zeit: R-Ctrl 75 Sekunden ( $\pm 49$  s), R-Mino 48 Sekunden ( $\pm 26$  s), R-Indo 56 Sekunden ( $\pm 15$  s). Schließlich benötigten die Tiere 28 Tage postoperativ vergleichbare Zeiten um die 25 Pellets zu greifen: R-Ctrl 31 Sekunden ( $\pm 14$  s), R-Mino 35 Sekunden ( $\pm 4$  s), R-Indo 37 Sekunden ( $\pm 10$  s). Im Vergleich der Versuchsgruppen untereinander ergaben sich zu allen drei Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede.

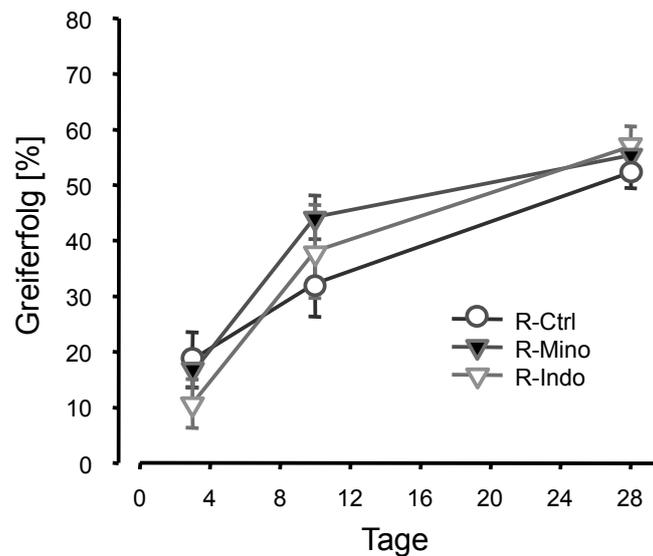


Abbildung 5.5: : Verbesserung des Greiferfolgs beim Greifen von 25 Pellets von Tag 3 bis Tag 28 postoperativ. An den Versuchstagen 3, 10 und 28 wurde der Greiferfolg beurteilt. Die Daten wurden als Mittelwert aller Tiere einer Versuchsgruppe zusammen mit der jeweiligen Standardabweichung dargestellt.

Für alle Tiere wurde an Tag 3, 10 und 28 eine Videoaufnahme beim Training angefertigt, welche anschließend bezüglich des Greiferfolgs analysiert werden konnte (Abb. 5.5). Ein Misserfolg lag vor, wenn das Pellet verfehlt wurde, von der Ablage gewischt wurde oder beim Führen aus der Pfote fiel. Schließlich wurde eine prozentuale Erfolgsmenge ermittelt. Beim ersten Training drei Tage postoperativ hatten alle Tiere noch sehr geringe Erfolgsquoten, wobei Tiere mit Scheinmedikation (NaCl), R-Ctrl, 19 Prozent ( $\pm 16$  %) der Pellets griffen, Tiere mit Minocyclin (R-Mino) 16 Prozent ( $\pm 8$  %) und Tiere mit Indometacin-Injektionen (R-Indo) 11 Prozent ( $\pm 11$  %). Zehn Tage postoperativ hatte sich die Erfolgsquote schon vervielfacht, Tiere mit Scheinmedikation (S-Ctrl) erreichten 32 Prozent ( $\pm 20$  %), Tiere mit Minocyclin (R-Mino) 44 Prozent ( $\pm 12$  %) und Tiere mit Indometacin-Injektionen (R-Indo) 38 Prozent ( $\pm 22$  %). Nochmal 18 Tage später (Tag 28 postoperativ) verbesserten sich die Tiere nur um eine geringe Quote: R-Ctrl 52 Prozent ( $\pm 9$  %), R-Mino 55 Prozent ( $\pm 5$  %), R-Indo 58 Prozent ( $\pm 10$  %). Zu keinem Messzeitpunkt unterschieden sich die drei Versuchsgruppen signifikant.

### 5.3 Einfluss von Indometacin und Minocyclin auf die Neurogenese

Zwischen den Versuchstiergruppen zeigten sich erhebliche Unterschiede im Überleben der BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus des Hippocampus. Diese Effekte waren immer bilateral ausgeprägt, was bedeutet, dass sich für beide Hemisphären vergleichbare Zellzahlen ergaben (Tabelle 5.1). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Ergebnisse als Summe beider Hemisphären präsentiert.

Zunächst erfolgte die Auszählung aller Zellen, die BrdU inkorporiert hatten und sich in der Subgranulärzone des hippocampalen Gyrus dentatus befanden. Hierfür wurde jeder sechste Peroxidase-gefärbte Hirnschnitt lichtmikroskopisch betrachtet und ausgezählt (Abb. 5.6).

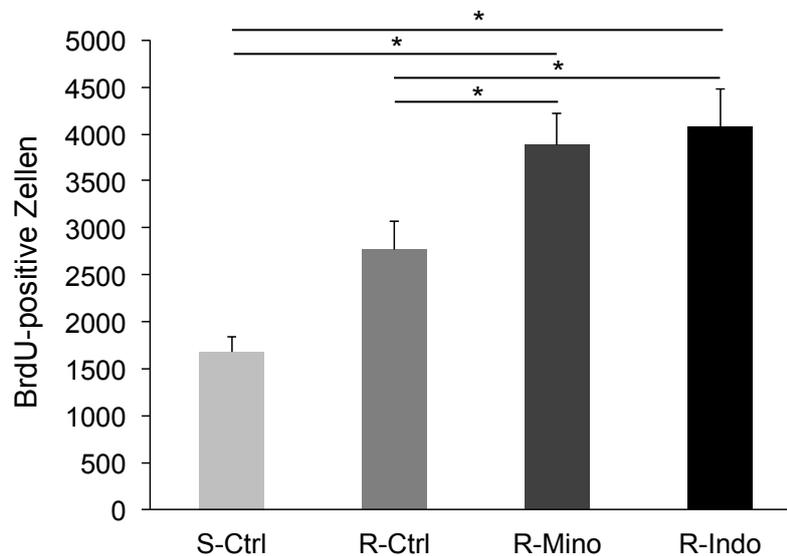


Abbildung 5.6: In diesem Säulendiagramm wurden die Gesamtzahlen der BrdU-positiven Zellen der verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte der Tiere einer Versuchsgruppe  $\pm$  Standardfehler. Linien mit Stern repräsentieren zueinander signifikant unterschiedliche Werte.

Die höchste Anzahl neu gebildeter Zellen wurde in Tieren, die Greiftraining erhalten hatten und dazu mit Indometacin behandelt wurden (R-Indo), gefunden (BrdU+ gesamt:  $4068 \pm 410$  Standardfehler (SE)). Eine vergleichbare Anzahl (BrdU+ gesamt:  $3883 \pm 334$  SE) neu gebildeter Zellen besaßen Tiere mit Greiftraining und

Minocyclinthherapie (R-Mino). Im Vergleich zu diesen ersten beiden Gruppen konnte bei Tieren mit Greiftraining und Kochsalzinjektionen eine signifikant geringere BrdU-Zellzahl gefunden werden ( $2768 \pm 298$  SE; R-Ctrl : R-Indo  $p = 0,039$ ; R-Ctrl : R-Mino  $p = 0,028$ ). Die, zu den Gruppen mit Greiftraining, signifikant geringste Anzahl ( $1679 \pm 154$  SE) neu entstandener Zellen fand sich bei der Kontrollgruppe (S-Ctrl : R-Indo  $p = 0,001$ ; S-Ctrl : R-Mino  $p < 0,001$ ). Im Vergleich beider Gruppen mit Kochsalzbehandlung mit und ohne Greiftraining wurde kein signifikanter Unterschied gefunden (S-Ctrl : R-Ctrl). Zusammenfassend lässt sich beschreiben, dass die Tiere mit der intensiven Kombinationstherapie aus Greiftraining und antiinflammatorischer Medikation die meisten BrdU-positiven Zellen gebildet hatten.

Im nächsten Schritt wurde anhand der Gesamtzahl BrdU positiver Zellen und der relativen Menge der NeuN-positiven Zellen die Gesamtzahl NeuN-BrdU-positiver Zellen berechnet (Tabelle 5.1, Abb. 5.7). Durch rehabilitatives Training der beeinträchtigten Vorderpfote der Tiere (R-Ctrl) konnte eine signifikante Steigerung der NeuN-BrdU-positiven Zellen (+ 55 %;  $p = 0,038$ ) erreicht werden, wenn diese mit der Versuchstiergruppe ohne Training (S-Ctrl) verglichen wurden (Tabelle 5.1, Abb. 5.7). Diese Steigerung der Anzahl neu entstandener Nervenzellen konnte durch die Kombination aus Greiftraining und der Behandlung mit Indometacin (R-Indo) und Minocyclin (R-Mino) noch weiter erhöht werden. Die Kombinationsbehandlung führte zu einer Steigerung der Neurogenese bei Tieren mit Minocyclin-Behandlung um 60 % (R-Mino;  $p = 0,002$ ) und bei Tieren mit Indometacin-Behandlung um 72 % (R-Indo,  $p = 0,006$ ), verglichen mit Tieren, die lediglich Greiftraining erhielten. Ein noch stärkerer Effekt zeigt sich im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe (S-Ctrl), also ohne Training und ohne antiinflammatorische Therapie. Hier entstanden mehr als die doppelte Anzahl neuer Nervenzellen, wobei es sich um eine relative Steigerung von 147 % bei Tieren mit Minocyclin-Therapie und Greiftraining handelt (R-Mino;  $p < 0,001$ ) und um 72 % bei Tieren mit Indometacin-Therapie (R-Indo;  $p = 0,001$ ). Dargestellt wurden diese Ergebnisse in Abbildung 5.7 und Tabelle 5.1. Zwischen den Versuchsgruppen, die sich nur durch Indometacin und Minocyclin-Therapie unterschieden, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

## Ergebnisse

Gruppe		ipsilateral			kontralateral		
		Mittelwert	±	SD	Mittelwert	±	SD
<b>S- Ctrl</b> (n=8)	BrdU <sup>+</sup> gesamt	<b>853</b>	±	<b>216</b>	<b>826</b>	±	<b>260</b>
	NeuN <sup>+</sup> (%)	76.5	±	6.9	77.6	±	9.2
<b>R- Ctrl</b> (n=20)	BrdU <sup>+</sup> gesamt	<b>1479</b>	±	<b>866<sup>a</sup></b>	<b>1293</b>	±	<b>593</b>
	NeuN <sup>+</sup> (%)	75	±	10.1	77.6	±	11.2
<b>R- Mino</b> (n=10)	BrdU <sup>+</sup> gesamt	<b>1993</b>	±	<b>515<sup>a b</sup></b>	<b>1890</b>	±	<b>631<sup>a b</sup></b>
	NeuN <sup>+</sup> (%)	86.1	±	7.4 <sup>a b</sup>	86.2	±	8.0 <sup>a</sup>
<b>R- Indo</b> (n=6)	BrdU <sup>+</sup> gesamt	<b>2024</b>	±	<b>319<sup>a b</sup></b>	<b>2044</b>	±	<b>695<sup>a b</sup></b>
	NeuN <sup>+</sup> (%)	87.3	±	9.1 <sup>b</sup>	86.7	±	5.6 <sup>a</sup>

*Tabelle 5.1: Die hier angegebenen Zahlen repräsentieren die ausgezählten BrdU-positiven Zellen aus der Peroxidase-Methode sowie den prozentualen Anteil NeuN/BdrU-positiver Zellen aus der konfokalen Phänotypisierung mit den Standardabweichungen. Wenn signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zur Standardtherapie bestanden (S-Ctrl), wurden die Werte mit einem hochgestellten „a“ markiert. Signifikante Unterschiede zur Greiftherapie ohne zusätzliche Medikation (R-Ctrl) wurden mit einem hochgestellten „b“ markiert.*

In der Zusammenschau dieser Ergebnisse zeigte sich, dass eine antiinflammatorische Therapie entweder mit Minocyclin oder mit Indometacin zu einer Steigerung der trainingsinduzierten Neurogenese nach kortikalen Hirninfarkten bei Ratten führt.

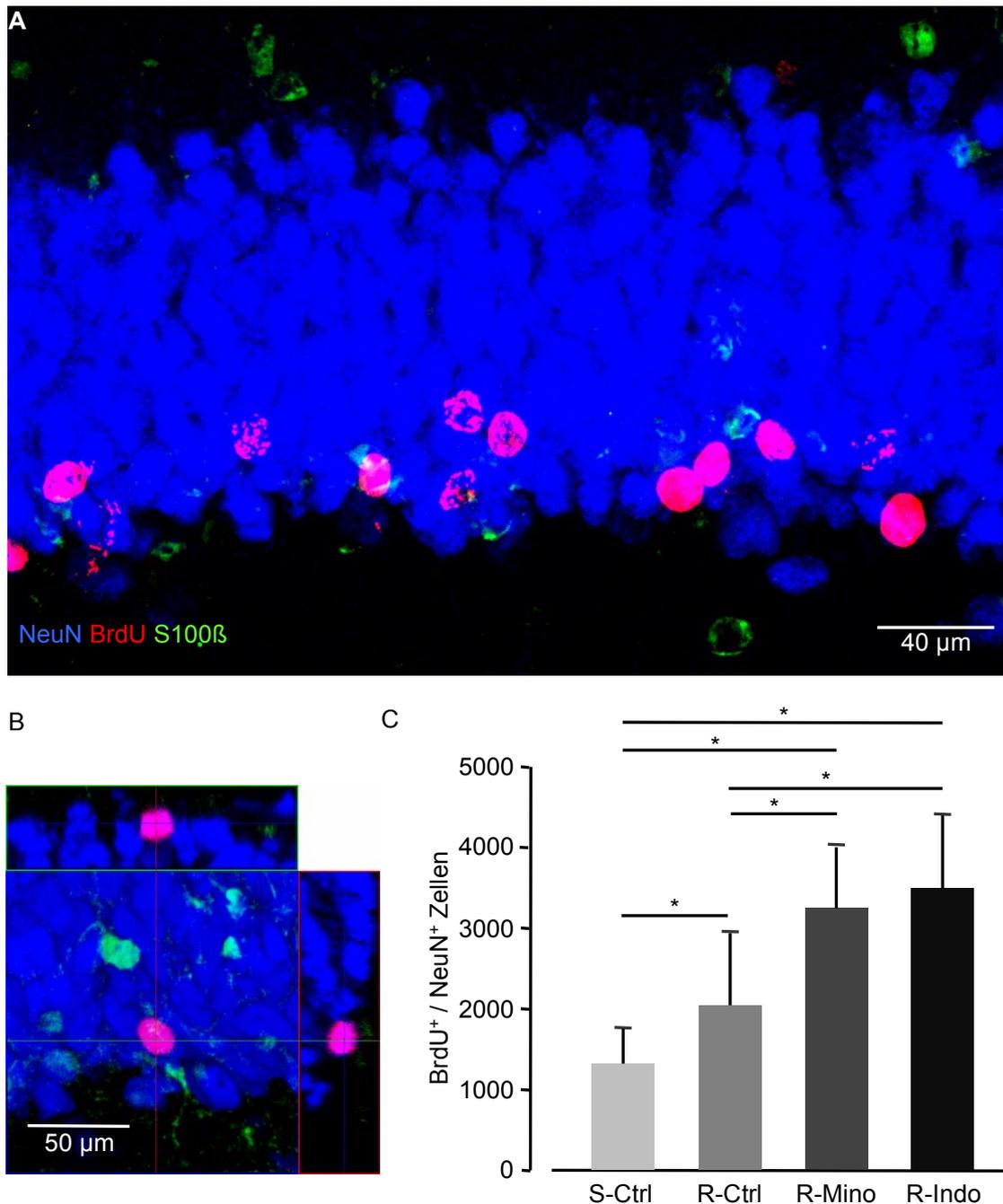


Abbildung 5.7: Dreifach-Fluoreszenzfärbung der hippocampalen Körnerzellschicht. ‚A‘ zeigt eine digitale Aufnahme durch das konfokale Laser-Raster-Mikroskop (LSM). Rot fluoreszieren BrdU-positive Zellen, blau NeuN-positive Neurone und grün Gliazellen. Werden in einer Zelle NeuN und BrdU kolokalisiert, handelt es sich um ein neu gebildetes Neuron. In ‚B‘ wurde eine dreidimensionale Zellanalyse abgebildet. Zur sicheren Differenzierung einer Doppelfärbung von akkumulierenden Zellen wird ein Hirnschnitt in vielen Tiefenebenen (Z-Stack) gerastert. Durch die dreidimensionale Rekonstruktion kann der Phänotyp sicher bestimmt werden. ‚C‘ stellt die errechnete Gesamtzellzahl NeuN/BrdU-positiver Zellen in einem Säulendiagramm grafisch dar. Es wurden die Mittelwerte der Tiere einer Versuchsgruppe  $\pm$  Standardabweichung abgebildet. Linien mit Stern symbolisieren zueinander signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

#### **5.4 Einfluss von Indometacin und Minocyclin auf residente Mikroglia**

Mit der Studie von Liebigt und Kollegen (2012) wurde gezeigt, dass Minocyclin und Indometacin jeweils die Aktivierung und Proliferation der Mikroglia in der unmittelbaren Infarktumgebung im Kortex hemmen (Liebigt et al. 2012).

Es wurde eine ergänzende Auswertung der zusätzlichen Versuchsgruppen (siehe 4.4.1) 14 Tage postoperativ vorgenommen (Abb. 5.8). Wobei die Tiere nach diesem relativ kurzen Überlebenszeitraum transkardial perfundiert und immunhistochemisch aufgearbeitet wurden.

Um vergleichbare Befunde, wie bei der Studie von Liebigt und Kollegen, für den von uns untersuchten Hippocampus herauszuarbeiten, wurden Hirnschnitte mit Antikörpermarkern gegen ED1 gefärbt, welche an das Oberflächenantigen CD68 aktivierter Mikroglia binden. Ergänzend wurden ebenfalls immunhistochemische Färbungen mit Antikörpermarkern gegen Iba1 durchgeführt, welche residente und aktivierte Makrophagen und Mikroglia färben. Vierzehn Tage nach dem Infarkt konnten vermehrt aktivierte Mikroglia in der Infarktumgebung detektiert werden (Liebigt et al. 2012), allerdings gelang in der vorliegenden Studie dieser Nachweis nicht für die hippocampale Region. Im Gegensatz dazu konnten mit Hilfe von Iba1 zahlreiche, residente Mikroglia im Gyrus dentatus dargestellt werden (Abb. 5.8). Die Tiere mit Indometacin-Therapie und Greiftraining zeigten 14 Tage postoperativ 30411 Iba1-positive Mikroglia ( $\pm 3090$ ), dicht gefolgt von Tieren mit gleicher Behandlung und Minocyclin als Medikation. Diese Gruppe zeigte 30507 ( $\pm 6941$ ) Iba1-positive Mikroglia. Schließlich konnte von der Kontrollgruppe (S-Ctrl) kein Unterschied zu den Tieren mit antiinflammatorischer Therapie gezeigt werden, da diese Gruppe 27501 ( $\pm 4326$ ) Iba1-positive Mikroglia besaß. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen im Vergleich der Anzahl Iba1-positiver residenter Mikroglia feststellen.

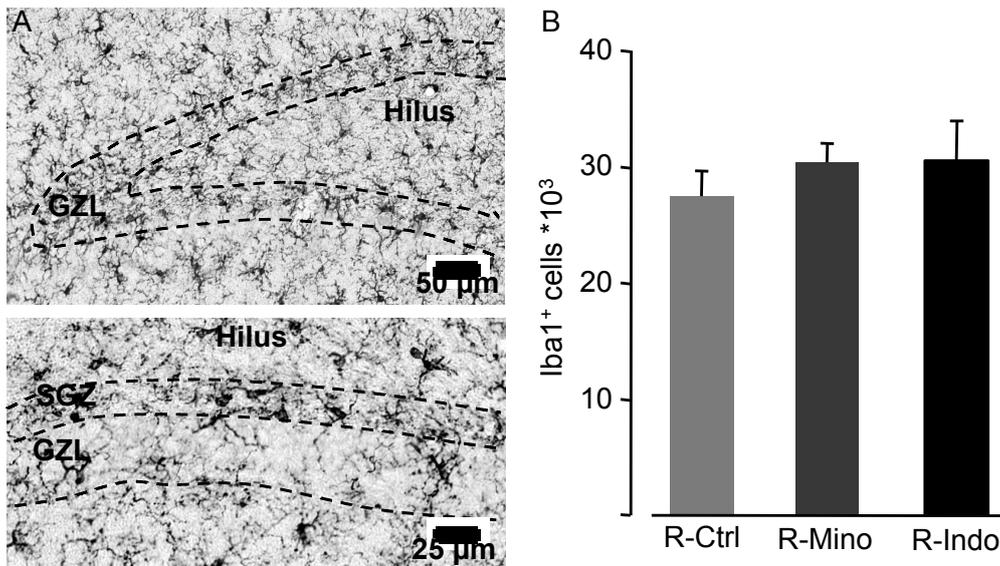


Abbildung 5.8: Untersuchung der Iba1-positiven Peroxidase-gefärbten Mikroglia des Gyrus dentatus 14 Tage nach photothrombotischer Infarzierung. ‚A‘ zeigt eine nachbearbeitete Aufnahme durch das Lichtmikroskop der Iba1-markierten Mikroglia eines koronaren Hippocampusschnitts. Die dunkel gefärbten, ramifizierten Zellen wurden als residente Mikroglia identifiziert, die gestrichelten Eingrenzungen markieren die Körnerzellschicht (GZL) sowie die Subgranulärzone (SGZ) der Hippocampusregion CA1. ‚B‘ Iba1-positiv Zellen wurden für drei verschiedene Versuchsgruppen mit Greiftraining quantifiziert. Dargestellt wurden die Mittelwerte zusammen mit der jeweiligen Standardabweichung.

### 5.5 Effekte der hippocampalen Neurogenese auf die Lernleistung

In früheren Studien wurde gezeigt, dass gesteigerte Neurogenese mit besserer hippocampaler Leistung einhergeht, was darauf hindeutet, dass diese Befunde auch funktionell relevant sind (Drapeau 2003, Wurm et al. 2007).

Als Paradigma für die hippocampale Leistung wurde der Morris Wasserlabyrinth-Test eingesetzt. Mit diesem Verfahren wurde über sieben Tage das räumliche Lernverhalten der Tiere ermittelt, erfasst wurden die Strecke sowie die Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform. In den ersten vier Tagen verbesserte sich die Lernleistung täglich und erreichte ab Tag 5 ein Plateau (Abb. 5.9 A). Eine weitere Verbesserung (bei gleichbleibender Schwimmgeschwindigkeit) war aufgrund der Auffindung der direkten Schwimmroute aus allen Startpositionen nicht möglich. Zur weiteren Analyse der Lernkurven wurde das gemittelte Flächenintegral (engl. ‚AUC =

area under the curve') pro Gruppe berechnet. Je kleiner das ermittelte Flächenintegral war, desto besser war die Lernfähigkeit der Versuchsgruppe.

Die Ergebnisse des räumlichen Lernverhaltens zeigten gegen Ende des Experimentes einen tendenziellen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Es konnten keine Signifikanzen für die Lernkurven der Latenz (siehe Tabelle 5.2, Abb. 5.9 A) oder Wegstrecke (siehe Tabelle 5.3) bis zum Auffinden der Plattform ermittelt werden. Schließlich ergab die Analyse des Flächenintegrals (siehe Abb. 5.9 B) der Lernkurven aus Abbildung 5.9 A eine geringgradig bessere Lernleistung der Tiere mit Greiftraining, verglichen mit der Standardkontrollgruppe (S-Ctrl). Statistische Signifikanz wurde nur im Vergleich zwischen der Greiftrainingsgruppe mit Indometacin-Therapie (R-Indo) und der Standardkontrollgruppe erreicht (S-Ctrl).

Die gemessenen Latenzen und Wegstrecken bis zum Erreichen der Plattform an den einzelnen Versuchstagen wurden in Tabelle 5.2 und 5.3 dargestellt.

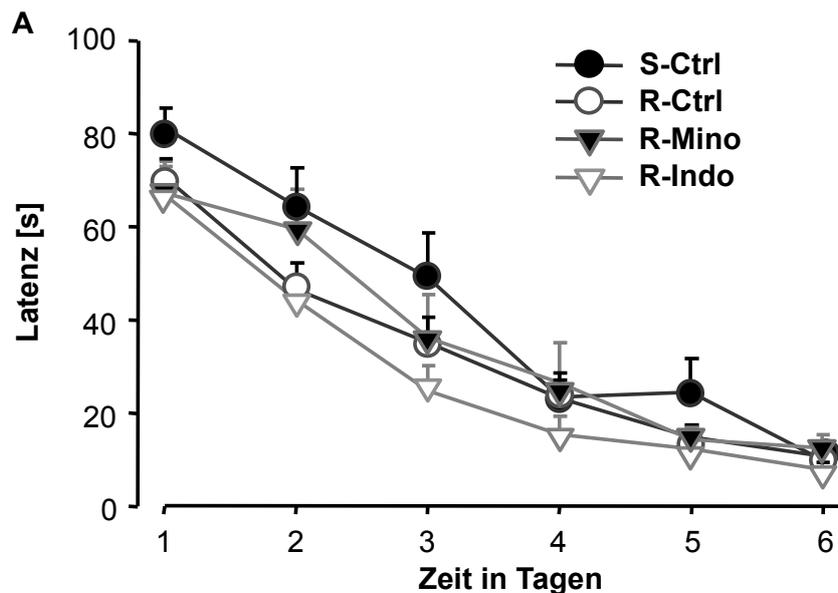
	S-Ctrl		R-Ctrl		R-Mino		R-Indo	
	<b>Latenz [s]</b>	SD						
1. Tag	81	± 11	70	± 17	67	± 17	67	± 17
2. Tag	64	± 23	47	± 25	59	± 26	44	± 8
3. Tag	49	± 26	36	± 24	36	± 29	25	± 13
4. Tag	24	± 14	24	± 17	27	± 26	16	± 10
5. Tag	25	± 20	15	± 9	15	± 10	13	± 5
6. Tag	11	± 5	11	± 6	13	± 9	9	± 3
<b>AUC</b>	<b>209</b>	± 71	<b>162</b>	± 73	<b>176</b>	± 89	<b>136</b>	± 37

*Tabelle 5.2: In dieser Tabelle wurden die mittleren Tagesleistungen der Versuchsgruppen als Mittelwert der vier Schwimmrouten zusammen mit der Standardabweichung (SD) dargestellt. In der untersten Zeile wurde das errechnete Flächenintegral unter der Lernkurve (AUC) mit der jeweiligen Standardabweichung abgedruckt.*

## Ergebnisse

	S-Ctrl		R-Ctrl		R-Mino		R-Indo	
	Strecke [cm]	SD	Strecke [cm]	SD	Strecke [cm]	SD	Strecke [cm]	SD
1. Tag	1436	± 282	1380	± 322	1376	± 365	1500	± 449
2. Tag	1573	± 418	1067	± 399	1465	± 591	1182	± 224
3. Tag	1295	± 562	843	± 473	847	± 551	858	± 411
4. Tag	627	± 319	568	± 386	550	± 455	393	± 280
5. Tag	600	± 434	360	± 228	285	± 150	243	± 58
6. Tag	279	± 165	278	± 165	266	± 170	180	± 49
<b>AUC</b>	<b>4952</b>	± 1381	<b>3667</b>	± 1321	<b>3917</b>	± 1575	<b>3516</b>	± 992

*Tabelle 5.3: Vergleichbar mit der vorhergehenden Tabelle wurde hier die mittlere Tagesleistung der Tiere einer Versuchsgruppe als Mittelwert der vier Schwimmrouten bis zur Plattform gemeinsam mit der Standardabweichung (SD) dargestellt. In der untersten Zeile wurde das errechnete Flächenintegral unter der Lernkurve (AUC) mit der jeweiligen Standardabweichung abgedruckt.*



*Abbildung 5.9 A: Latenz im Morris Wasserlabyrinthtest. In diesem Diagramm lässt sich erkennen, wie schnell (Latenz in Sekunden) die Tiere der verschiedenen Versuchsgruppen im Durchschnitt die Plattform auffanden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Daten wurden als Mittelwerte der vier Richtungen sowie der Versuchsgruppe gemeinsam mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt.*

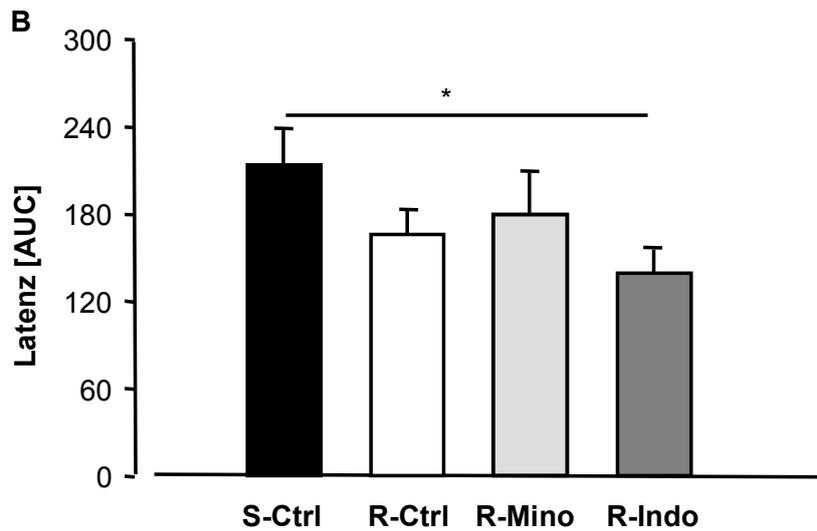


Abbildung 5.9 B: Analyse des Flächenintegrals der in 5.9 A dargestellten Latenzen. Eine signifikant bessere Leistung erbrachten Tiere mit der Kombinationsbehandlung Greiftraining und Indometacintherapie (R-Indo) im Vergleich zur Standardkontrollgruppe (S-Ctrl). Dargestellt wurde das berechnete Flächenintegral aus den jeweiligen Tagesmittelwerten der Tiere einer Versuchsgruppe. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler und Linien mit Stern Signifikanzen an ( $p < 0,05$ ).

Bei der Auswertung der Schwimgeschwindigkeit, welche auf motorische Defizite der Tiere hinweisen würde, wurden keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt (Abb. 5.9 C). Auch im Vergleich der Flächenintegrale unter den Schwimgeschwindigkeitskurven zeigten sich keine Unterschiede. Zur Vergleichbarkeit der Schwimm latenzen ist eine homogene Schwimgeschwindigkeit eine gute Voraussetzung. Eine motorische Benachteiligung würde die Einschätzung der Hippocampusfunktion im Morris Wasserlabyrinth-Test verfälschen. Da die Schwimgeschwindigkeit mit Hilfe der Schwimmstecke und der Latenz berechnet wurde, korrelieren folglich die Ergebnisse der Latenz mit denen der Streckenmessung. Auf eine grafische Darstellung des Lernverhaltens mit Hilfe der Schwimmstrecke wurde verzichtet.

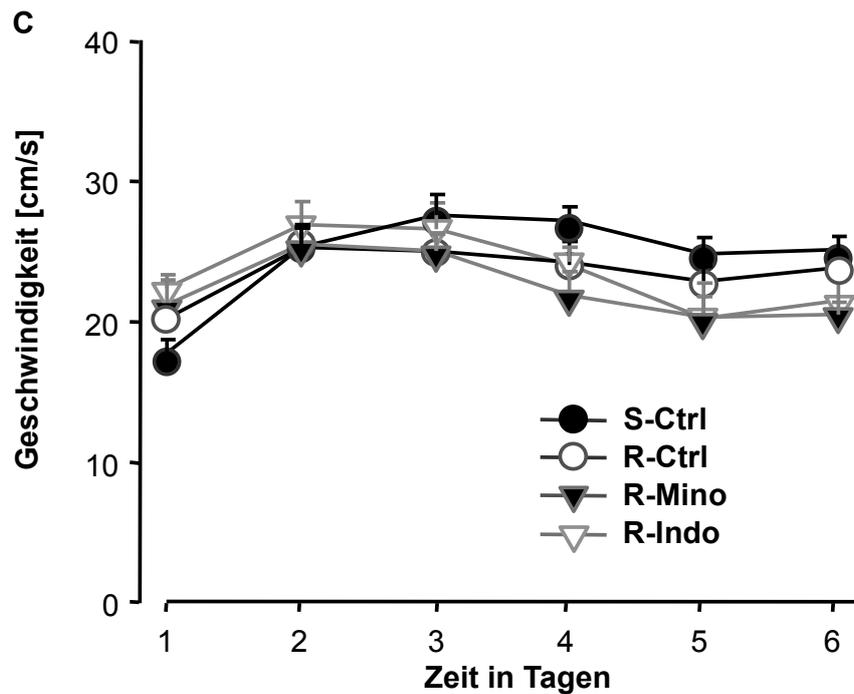


Abbildung 5.9 C: Im Vergleich der gemittelten Schwimgeschwindigkeiten der Versuchsgruppen zeigten sich keine Unterschiede.

Bei der Auswertung des letzten Versuchsteils, dem ‚Probe-Trial‘, bei welchem vor allem das räumliche Gedächtnis getestet werden sollte, zeigten sich ebenfalls kaum Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Bei diesem Versuch wurde die Plattform aus dem Schwimmbecken entfernt, die Tiere wurden für 60 Sekunden im bekannten Schwimmbecken eingesetzt und mit Hilfe der Videoanalyse die Aufenthaltsdauer im Zielbereich (Süd-West-Quadrant, ehemalige Plattform), bestimmt. Die Tiere der Kontrollgruppe (S-Ctrl) hielten sich im Mittel für 22 Sekunden ( $\pm 7$  s) im Zielbereich auf. Tiere mit Greiftraining und Scheinmedikation (R-Ctrl) 24 Sekunden ( $\pm 6$  s), Tiere mit Greiftraining und Minocyclinterapie 25 Sekunden ( $\pm 6$  s) und die Greiftrainingsgruppe mit Indometacin-Therapie verblieben im Durchschnitt für 24 Sekunden ( $\pm 5$  s) im Zielquadrant. Insgesamt ergaben sich für alle vier Gruppen annähernd identische Resultate, ohne signifikante Unterschiede.

Im Verhältnis zu der sehr starken Steigerung der hippocampalen Neurogenese bei Tieren mit Kombinationstherapie (Greiftraining plus antiinflammatorische Medikation), zeigte sich in der funktionellen Leistung nur ein sehr geringer Effekt.

## 6 Diskussion

Die vorliegende Studie zeigt, dass eine Kombination aus entzündungshemmender Medikation und Rehabilitationstraining am Tiermodell zu einer signifikanten Steigerung der Neurogenese im Hippocampus nach experimentellen Schlaganfällen führt. Für die Versuchsgruppen mit Rehabilitationstraining und Medikation erbrachten Indometacin und Minocyclin über unterschiedliche Signalwege vergleichbare Ergebnisse. Beide Versuchsgruppen reagierten mit einem Anstieg der Neurogenese-Rate im Hippocampus um etwa 60% gegenüber Tieren mit Kochsalzlösungsinjektionen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe verdoppelte sich die Anzahl neuer Nervenzellen. Überraschenderweise zeigten sich trotz des starken Anstiegs der Neurogenese nur marginale Effekte im Wasserlabyrinth nach Morris. Bei der integralen Analyse der Lernkurven konnten lediglich für Tiere mit Greiftraining und Indometacintherapie (R-Indo) signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (S-Ctrl) nachgewiesen werden.

Im intakten Hirn erreicht die, durch Greiftraining induzierte, Steigerung der hippocampalen Neurogenese eine vergleichbare Intensität wie bekannte Neurogenese-Stimulatoren, zum Beispiel eine reizangereicherte Umgebung (Kempermann et al. 1997) oder Laufen im Laufrad (van Praag et al. 1999).

Auch fokale kortikale Infarkte lösen eine bilaterale Steigerung der hippocampalen Neurogenese aus (Kunze et al. 2006, Wurm et al. 2007, Kluska et al. 2005). Die zuvor beschriebenen Möglichkeiten zur Steigerung der Neurogenese bei gesunden Tieren wurden auch an Tiermodellen mit Hirninfarkt angewendet. Es zeigte sich, dass sich das Ausmaß der Neurogenese im Gyrus dentatus (NeuN/BrdU-positive Zellen) nach kortikalen Infarkten durch eine reizreiche Umgebung aber auch durch gezieltes Greiftraining der geschädigten Vorderpfote weiter steigern lässt (Wurm et al. 2007). Greiftraining nach Schlaganfall besitzt einen deutlich besseren Steigerungseffekt auf die Neurogenese als die Standardbehandlung. Überraschenderweise zeigte sich, dass Tiere mit kortikalem Infarkt und Greiftraining dennoch weniger neue Nervenzellen als gesunde Kontrolltiere mit Greiftraining erreichen (Abb. 2.2) (Wurm et al. 2007). Dieses Defizit der Infarkttiere mit Greiftraining, im Vergleich zu gesunden Tieren mit Greiftraining, konnte bisher

wissenschaftlich nicht hinreichend erklärt werden. In dieser Studie wurde an diese Vorergebnisse angeknüpft und gezeigt, dass das neurogenetische Defizit durch antiinflammatorische Medikation teilweise kompensiert werden kann.

In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte belegt werden, dass trainingsinduzierte Neurogenese nach experimentellem Schlaganfall durch pharmakologische Behandlung weiter gesteigert werden kann. Dieses Resultat wurde durch die Kombination aus rehabilitativem Training und entzündungshemmender Medikation in den ersten Wochen nach fokaler Ischämie erreicht. Im Vergleich mit den Vorergebnissen der scheinoperierten gesunden Tieren, die alle tägliches Greiftraining erhielten (Wurm et al. 2007) (siehe Abb. 2.2), konnte schließlich in dieser Studie eine vergleichbar hohe Rate neuer Nervenzellen erreicht werden (siehe Abb. 5.7).

### **6.1 *Physiologische Bedeutung des Immunsystems für die Neurogenese***

Entzündliche Prozesse beeinflussen die adulte Neurogenese sowohl in geschädigten als auch in Hirnen gesunder Tiere. Ziv und Kollegen konnten die bedeutende Rolle von T-Lymphozyten und Mikroglia für die adulte Neurogenese und das räumliche Lernen belegen (Ziv et al. 2006). Sie zeigen, dass die Steigerung der hippocampalen Neurogenese durch eine reizreiche Umgebung mit der Rekrutierung von T-Lymphozyten und Aktivierung von Mikroglia einhergeht. Wenn die Neurogenese im Gyrus dentatus immungeschwächter transgener Mäuse ausgeschaltet wurde, konnte sie nicht durch eine reizreiche Umgebung stimuliert werden. Gleichwohl konnte bei diesen Tieren die Neurogenese durch ZNS-spezifische T-Zellen reaktiviert werden. Das weist, im Gegensatz zu bisherigen Annahmen (Ekdahl et al. 2003), auf die notwendige Anwesenheit von Immunzellen bei der Reifung neuer Nervenzellen hin. Eine weitere Studie unterstützt diese Resultate (Wolf et al. 2009) und zeigt, dass die basale Entstehung neuer Nervenzellen im intakten Hirn von der Anwesenheit CD4-positiver T-Lymphozyten abhängig ist. In dieser Untersuchung führte die systemische Verminderung oder Depletion der CD4-positiven T-Lymphozyten zu einer Verminderung der Neurogenese. Wurde den Tieren der Zugang zum Laufrad ermöglicht, wirkte sich die regelmäßige körperliche Aktivität positiv auf die Bildung

neuer Nervenzellen aus. Dies führt zu der Annahme, dass die basale Mitoserate neuronaler Vorläuferzellen im intakten Hirn einer Steuerung durch T- Zellen unterliegt.

## **6.2 Bedeutung postischämischer Immunreaktion für die Neurogenese**

Die Aktivierung der Mikroglia in ausgedehnten Hirnregionen als Folge einer strukturellen Hirnschädigung bestätigte sich in Tierversuchen (Sierra et al. 2010, Morrens et al. 2011). Auch die exogene Applikation bakterieller Endotoxine, wie Lipopolysaccharid, führt zu einer generalisierten Mikrogliaaktivierung. Aktivierte Mikroglia reduzieren das Überleben neu gebildeter Neurone erheblich, sowohl bei gesunden als auch bei Tieren mit artifiziellem Schlaganfall (Ekdahl et al. 2003). Führt man einer Zellkultur mit hippocampalen Vorläuferzellen Lipopolysaccharid-aktivierte Mikroglia zu, wird deren Ausdifferenzierung behindert. Werden einer Kultur dagegen die Lipopolysaccharide direkt hinzugefügt, wird die Differenzierung der Vorläuferzellen nicht beeinträchtigt (Monje et al. 2003). Daraus lässt sich schließen, dass vor allem die aktivierten Mikrogliazellen die neurogenetische Differenzierung und damit auch das Überleben neu gebildeter Nervenzellen im Hippocampus durch inflammatorische Kaskaden behindern. Wie zuvor beschrieben, könnten auch in der postischämischen Phase aktivierte Mikroglia die T-Helferzellantwort modulieren, da sie nach Aktivierung entsprechende Antigene präsentieren (Aloisi 2001). Weitere wichtige proinflammatorische Zytokine sind Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Sasaki et al. 2003). Auch in anderen Schlaganfallmodellen wurde eine Erhöhung dieser Zytokine im Hirn und im peripheren Immunsystem (Milz, Leber, Lymphknoten, Blut) gefunden (Offner et al. 2005). Nach einem Schlaganfall kommt es zu einer generalisierten Immunreaktion, die zur Aktivierung zerebraler Mikroglia führt, nicht nur in der Infarktumgebung, sondern auch in entfernteren subkortikalen Hirnregionen (Schroeter et al. 1999).

Ohne hierbei die pathophysiologischen Abläufe detailliert zu betrachten, zeigen die Resultate dieser Studie, dass sich die Hemmung der Entzündungskaskade vorteilhaft auswirkt. Durch Entzündungshemmung wurde die Anzahl neuer Nervenzellen erhöht und durch die Kombination mit rehabilitativem Training das funktionelle Outcome

verbessert. Die vorgelegten Daten legen somit nahe, dass die Aktivierung der Immunabwehr nach Schlaganfall die trainingsinduzierte Neurogenese beeinträchtigt.

Obwohl der genaue Mechanismus, über den antiinflammatorische Medikamente neuroprotektiv wirken, noch nicht entschlüsselt werden konnte, wurde der Anstieg der Neurogenese durch Antiinflammation in verschiedenen Ischämie-Modellen empirisch ermittelt (Yrjänheikki et al. 1999, Hoehn et al. 2005, Liu et al. 2007, Sasaki et al. 2003, Stirling et al. 2005).

In der vorliegenden Studie konnte keine Veränderung Iba1-positiver Mikroglia des Gyrus dentatus in den antiinflammatorisch behandelten Versuchsgruppen ermittelt werden. Jedoch ist aus vergleichbaren Studien bekannt, dass Indometacin und Minocyclin zu einer starken Reduktion der postischämischen mikroglialen Aktivierung in der Infarktumgebung führen (Liebig et al. 2012).

### **6.3 Bedeutung von Minocyclin für die postischämische Neurogenese**

Minocyclin als semisynthetisches Breitband-Antibiotikum wirkt inhibitorisch auf die Aktivierung der Mikroglia im ZNS. Dabei werden vor allem Kaskaden via Stickstoffmonoxid, Glutamat, Zytokinliberatoren, COX und Lipooxygenasen-5 gestört und eine neuroprotektive Wirkung erzielt (Yrjänheikki et al. 1999, Zhao et al. 2009, Fagan et al. 2010). In der Studie von Liu (Liu et al. 2007) wurde gezeigt, dass durch eine vierwöchige Behandlung mit Minocyclin nach Schlaganfall im Gyrus dentatus signifikant weniger aktivierte Mikroglia aufzufinden sind. Der Unterschied zu der vorliegenden Untersuchung besteht zum einem im Schlaganfallmodell, denn Liu *et al.* verwendeten das Mediaokklusionsmodell. Hierfür wird ein Verschlussfaden via Arteria carotis interna in die Arteria cerebri media vorgeschoben, dies führt durch Hypoperfusion zu einem ischämischen Schlaganfall. Bei diesem Schlaganfallmodell werden weitaus größere Hirnareale lädiert und gelegentlich wird der Hippocampus direkt ischämisch oder indirekt durch das Hirnödem involviert. Ein anderer Unterschied der beschriebenen Studie zur vorliegenden war, dass die Mikrogliaaktivierung erst nach vier Wochen beurteilt wurde (hier nach zwei Wochen). Diese Differenzen machen einen direkten Vergleich schwierig, dennoch gilt aufgrund dieser und anderer Studien die mikrogliale Aktivierung nach Schlaganfall als belegt

(Stirling et al. 2005). Gelingt eine optimale Begrenzung der mikroglial vermittelten Inflammation, besteht die Möglichkeit, neuronale Plastizität zur Rehabilitation nach Schlaganfall zu nutzen. Verschiedene Veröffentlichungen beschreiben für unterschiedliche Infarktmodelle eine signifikante Reduktion des Infarktvolumens und eine Verbesserung des neurologischen Outcomes als Folge einer Behandlung mit Minocyclin (Yrjanheikki et al. 1999, Wang et al. 2003, Yu et al. 2006). Sehr hohe Applikationsdosen von Minocyclin können allerdings zu einer Reduktion der Neurogenese führen, trotz adäquater Immunsuppression (Kim et al. 2009). Daraufhin wurde eine sensible Dosisabhängigkeit des Neurogenese-fördernden Milieus ermittelt, das Mengen von 10 mg/kg KG bei der Ratte nicht überschreiten sollte (Xu et al. 2004, Matsukawa et al. 2009). Auch in einer klinischen Studien an Patienten mit Schlaganfall wurde für die postischämische Behandlung eine vergleichbare intravenöse Dosis als sicher befunden (Fagan et al. 2010). In der hier vorgestellten Untersuchung wurden ebenfalls Injektionen mit 10 mg/kg Minocyclin verabreicht und somit ein auf die Klinik übertragbares Applikationsschema gewählt.

#### **6.4 Bedeutung von Indometacin für die postischämische Neurogenese**

Das non-steroidale Medikament Indometacin wirkt über die Inhibierung des Signalwegs der Cyclooxygenasen, Leukotriene und der Transkription der Peroxisom-Proliferator aktivierten Rezeptoren (Hoehn et al. 2005, Fagan et al. 2010), welche den Anstieg proinflammatorischer Zytokine und die Aktivierung der Mikroglia bewirken (Sasaki et al. 2003). Die Arbeitsgruppe um Monje belegte die Reduktion peripherer Monozyten durch Indometacin, was in Folge zu einer Normalisierung der Expression entzündungsvermittelnder Chemokine führte (Monje et al. 2003). Eine Behandlung mit Indometacin führt zu einer höheren Anzahl neuer Nervenzellen zwei, vier und zehn Wochen nach einer photothrombotischen Läsion im Vergleich zu Tieren ohne das Medikament (Kluska et al. 2005, Hoehn et al. 2005).

Ein weiterer positiver Effekt der Kombinationsbehandlung aus Indometacin und Greiftraining zeigte sich in dieser Studie durch die Reduktion des Infarktvolumens. Man könnte annehmen, dass kleinere Infarktvolumina mit einem besseren physiologischen Outcome einhergehen, da quantitativ mehr Hirnmasse erhalten

bleibt. Hierfür sprechen die in dieser Studie durchgeführten Motoriktests an der Vorderpfote, wobei sich Tiere mit Medikation in der motorischen Funktion besser erholten. Hierfür wurde die Zeit und die Erfolgsrate der Tiere beim Greifen der Pellets erfasst. Es deutete sich eine tendenziell bessere feinmotorische Erholung der Tiere mit Medikation an, die allerdings statistisch kein Signifikanzniveau erreichte. Auch die funktionellen Leistungen der Versuchsgruppen mit Indometacin- versus Minocyclin-Therapie sind im Wasserlabyrinth statistisch gleich. Demzufolge scheint die antiinflammatorische Therapie unter der Bedingung, dass begleitend ein motorisches Training stattfindet, zu einer Verbesserung des funktionellen Outcomes zu führen.

### **6.5 Proneurogenetische Eigenschaften von Mikroglia**

In der vorliegenden Studie lies sich morphologisch und quantitativ keine postischämische Aktivierung der hippocampalen Mikroglia nachweisen. Jedoch besitzen auch Mikroglia, die als inaktiv identifiziert werden, wirksame Funktionen (Sierra et al. 2010). Wahrscheinlich wird durch den Einfluss beider Medikamente, auch ohne sichtbare Veränderungen der Mikroglia, deren Funktionsniveau beeinflusst. Hierbei könnte die Freisetzung Inflammations-vermittelnder Mediatoren und von Zytokinen eine Rolle spielen. Thored und Kollegen beschreiben einen proneurogenetischen Phänotyp von morphologisch inaktiven Mikroglia, welche die neuen Nervenzellen begleiten und unterstützen (Thored et al. 2009). Ein möglicher Mediator dieser Neurogenese-fördernden Funktionen der Mikroglia könnte TGF- $\beta$ 1 sein. Durch *in-vitro* und *in-vivo* Studien wurde TGF- $\beta$ 1-mRNA in der frühen Ischämiephase sowie in der späten Regenerationsphase in Mikroglia und Makrophagen lokalisiert. Dieses Zytokin dient als neuronaler Wachstumsfaktor und steigert die Neurogenese. Eine weitere Funktion residenter, morphologisch unauffälliger Mikroglia ist die frühe Phagozytose von Zelltrümmern und apoptotischen Zellen in der Subgranulärzone der Körnerzellschicht (Sierra et al. 2010). Inwiefern diese Prozesse durch Medikamente wie Indometacin und Minocyclin moduliert werden, ist bisher nicht wissenschaftlich untersucht. Auch die pharmakologischen Mechanismen, die zu einer Steigerung der Neurogenese in Schlaganfallmodellen durch diese Medikamente führen, sind zum aktuellen Zeitpunkt nicht wissenschaftlich

erklärbar. Versucht man diese gegensätzlichen Ansätze zusammenzuführen, kommt man zu dem Ergebnis, dass Mikroglia zum einen durch postischämische Entzündungsprozesse die Rehabilitation beeinträchtigen und zum anderen durch die Unterstützung von Wachstum und Entwicklung neuer Nervenzellen diese fördern (Ekdahl et al. 2009). Dabei scheint vor allem aktivierte Mikroglia inflammatorische Prozesse zu vermitteln (Ekdahl 2012). Mikroglia, die morphologisch und in immunchemischen Markierungen inaktiv konfiguriert ist, vermittelt möglicherweise hirnpotektive und rehabilitative Eigenschaften (Wake et al. 2012). Bei der Integration neuer Nervenzellen in funktionelle Netzwerke sind einige Komponenten des Immunsystems, wie die erwähnten CD4-T-Zellen, nach aktueller Studienlage essentiell (Wolf et al. 2009). In Zusammenschau mit dem Wissen über Neurogenese-fördernde körperliche Aktivität ist die aktuelle Studie der Arbeitsgruppe um Kohman besonders zu beachten. Hier zeigte sich, dass durch das Laufen im Laufrad die mikrogliale Proliferation vermindert und ein proneurogenetischer, mikroglialer Phänotyp besonders gefördert wird (Kohman et al. 2012). Diese Kombination aus trainingsinduzierten Verbesserungen der Rehabilitation und einer optimierten pharmakologischen Schlaganfalltherapie geben Anlass zu der Überlegung, das funktionellen Outcome von Schlaganfallpatienten durch solche Maßnahmen verbessern zu können.

## **6.6 Erörterung der funktionellen Bedeutung der Neurogenese**

Es konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Neurogenese im Gyrus dentatus nach einem Schlaganfall mit besseren Leistungen in Hippocampus-spezifischen Verhaltenstests einhergeht (Keiner et al. 2008, Wurm et al. 2007).

Um die funktionelle hippocampale Leistung zu beurteilen, wurde das Wasserlabyrinth nach Morris etabliert (D'Hooge und De Deyn 2001, Morris 1984). Ratten orientieren sich an Raummerkmalen, um eine rettende Plattform knapp unter der Wasseroberfläche eines Bassins aufzufinden. In einer Korrelationsuntersuchung ergab sich, dass eine höhere Anzahl neuer Nervenzellen mit einer besseren hippocampalen Lernleistung im Wasserlabyrinth einhergeht (Drapeau 2003). Gezeigt wurde in der vorliegenden Untersuchung, dass trainingsinduzierte Neurogenese

durch Kombinationstherapie mit Indometacin gesteigert wird. Der Versuch wurde am Ende der sechswöchigen Trainingszeit durchgeführt. Es war zu erwarten, dass Tiere, deren neue Nervenzellen funktionell integriert wurden, nach einer sechswöchigen Trainingszeit von deren Beitrag zur Plastizität profitieren würden. Allerdings konnten signifikante Resultate nur im Gesamtverlauf (integrale Analyse der Lernkurven) ermittelt werden (siehe Abbildung 5.9 B) und auch nur im Vergleich von Tieren mit beiden Behandlungen (Greiftraining und Indometacin) versus Kontrollgruppe. Im Vorfeld wurde eine höhere Evidenz aufgrund der signifikanten Steigerung der Neurogenese erwartet. Bei einer vorangehenden Untersuchung mit dem selben experimentellen Design zeigte sich für gesunde Kontrolltiere, die tägliches Greiftraining erhalten hatten, nicht nur eine erhebliche Steigerung der Neurogenese, sondern auch eine signifikant bessere hippocampale Lernleistung im Vergleich zu untrainierten Kontrolltieren (Wurm et al. 2007). Dieses Ergebnis erschien plausibel, da bereits gezeigt wurde, dass neu entstehende Körnerzellen im Gyrus dentatus bei gesunden Erwachsenen eine Voraussetzung für lebenslanges Lernen und Erinnern bilden (Deng et al. 2010). Die mangelnde Signifikanz der Unterschiede in der hippocampalen Lernleistung in dieser Studie könnte auf die eingeschränkte funktionelle Bedeutung der Neurogenese hinweisen. Zum anderen ist vermutlich die Aussagekraft des verwendeten Paradigmas für die hippocampale Leistung eingeschränkt.

Bisher wurde über viele Jahrzehnte das Wasserlabyrinth nach Morris zur Ermittlung der räumlichen Lernleistung als Ausdruck der hippocampalen Funktion eingesetzt. Dabei schien vor allem die hippocampale Neurogenese Einfluss auf den Lernerfolg zu nehmen. Allerdings ist dieser Test insbesondere für globale hippocampale Funktionen für Nager und Menschen repräsentativ (Bunsey und Eichenbaum 1996, Suzuki und Clayton 2000). Dank neuer Forschungsergebnisse zur Beteiligung hippocampaler Neurogenese an der Erkennung präziser neuraler Muster („pattern separation“) ist der Einsatz des Wasserlabyrinth zur Erfassung der Neurogenese in Frage gestellt worden (Sahay et al. 2011b).

Weitere wissenschaftliche Untersuchungen zeigen an verschiedenen Schlaganfall-Modellen, dass ein signifikanter Anteil der neuen Nervenzellen aberrante Verbindungen eingeht (Niv et al. 2012). Hiernach werden fünf bis zehn Prozent der

neuen Nervenzellen nach Schlaganfall fehlerhaft integriert. Diese aberranten Neurone tragen möglicherweise zu Funktionsverlusten, kognitiven Defiziten oder auch Epilepsie bei, wie man sie häufig im klinischen Verlauf bei Schlaganfallpatienten beobachten kann (Parent et al. 1997). Vermutlich führt die erhebliche quantitative Steigerung der Neurogenese nicht uneingeschränkt zu einer besseren hippocampalen Leistung. Dies könnte der Grund dafür sein, dass in der vorliegenden Untersuchung ein signifikant besserer Lernerfolg nur für Tiere mit einer Kombinationstherapie (Indometacin und Training), also intensivster Behandlung, ermittelt wurde. Bisher konnte auch in anderen Schlaganfallstudien ein besseres funktionelles Outcome bei hoher Neurogenese-Rate nur dann beobachtet werden, wenn Versuchstiere zusätzlich zu einer antiinflammatorischen Medikation auch rehabilitatives Training erhielten (Wurm et al. 2007, Zhao et al. 2010). In vielen anderen Schlaganfallstudien ohne rehabilitatives Training sind die Ergebnisse ambivalent, bezüglich hippocampaler Funktion bei durchgehend signifikanter Steigerung der Neurogenese (Meshi et al. 2006, Gould et al. 1999, Kempermann 2002, Shors et al. 2002). Ob rehabilitatives Training allein oder die Kombination mit antiinflammatorischer Medikation aberrante Neurogenese reduziert und die hippocampale Funktion verbessert, bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

### **6.7 *Einschränkungen dieser experimentellen Studie***

Das vorliegende Studiendesign wurde gezielt zur Untersuchung inflammatorischer Prozesse auf die trainingsinduzierte Neurogenese nach Schlaganfall konzipiert. Um die Entzündungsreaktion besonders gering zu halten, wurden Indometacin und Minocyclin schon einige Stunden vor dem experimentellen Schlaganfall injiziert. Dieses Applikationsschema eignet sich nur bedingt für klinische Anwendungen. Um eine weitere Bandbreite klinischer Versuche vorzubereiten, sollten zusätzlich weitere präklinische Tierstudien mit postläsioneller Gabe von antiinflammatorischen Medikamenten durchgeführt werden.

In dieser Studie lässt sich nicht beurteilen, in welchem Maße die Neurogenese nach einem Schlaganfall durch die alleinige Pharmakotherapie beeinflusst wird. Der Fokus

lag vor allem auf der Untersuchung und Optimierung der trainingsinduzierten Neurogenese. Nachdem nun die Resultate unerwartete Einschränkungen aufweisen, sollte der alleinige Effekt der Wirkung von Indometacin und Minocyclin auf die Neurogenese weiter untersucht werden. Bereits existierende Untersuchungen hierzu zeigten kontroverse Resultate (Ekdahl et al. 2009, Kim et al. 2009).

## 7 Schlussfolgerungen

Zusammengefasst konnte nachgewiesen werden, dass nach einem ischämischen Hirninfarkt die hippocampale Neurogenese durch die Kombinationstherapie aus Rehabilitationstraining und Entzündungshemmung am stärksten erhöht wird. Die so behandelten Tiere zeigten allerdings, bezogen auf die funktionelle hippocampale Leistung (Wasserlabyrinth nach Morris), nur eine geringe Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Daraus ergibt sich, dass die ausgeprägte Neurogenese nur eine beschränkte funktionelle Bedeutung hat. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass ein Anteil dieser Neurone aberrante Verbindungen eingeht und deshalb Fehlfunktionen verursacht (Niv et al. 2012).

Bisher konnten zwei klinische Studien in der Frühphase nachweisen, dass Minocyclin zur Akutbehandlung von Patienten mit Schlaganfall sicher eingesetzt werden kann als Monotherapie, aber auch in Kombination mit gewebespezifischem Plasminogenaktivatoren (Lampl et al. 2007, Fagan et al. 2010, 2011). Wenn man auf diese Studien aufbaut, ist die Grundlage für weitere Praxistests zur Erprobung von Minocyclin im Behandlungsregime von Schlaganfallpatienten gelegt. Um große klinische Studien vorzubereiten, werden weitere experimentelle Studien mit ergänzenden Tiermodellen und Applikationsschemata, die eine Medikamententherapie in verschiedenen Zeitintervallen nach dem Schlaganfall beinhalten, benötigt.

Außerdem zeigten sich weitere erfolgsversprechende Resultate in einer Studie zum gezielten Arm-Fähigkeits-Training. Nachdem Patienten einen Schlaganfall erlitten, ließen sich durch dieses gezielte Bewegungstraining beeinträchtigte Armfunktionen dauerhaft verbessern und die Feinmotorik weiter optimieren als mit der bisherigen Physiotherapie (Platz et al. 2001, Platz et al. 2005). Bisher unverstanden bleibt inwiefern individuelle, gezielte sensomotorische Trainingsprogramme nach Schlaganfall in Kombination mit adaptierter pharmakologischer Therapie die beeinträchtigte hippocampale Funktion verbessern. Möglicherweise lässt sich in Zukunft mit Hilfe spezialisierter Verhaltenstests (wie der Mustererkennung) die physiologische und pathologische Funktion der hippocampalen Neurogenese besser verstehen und in der klinischen Anwendung nutzen.

## 8 Literaturverzeichnis

Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. 2005. Adult Neurogenesis: From Precursors to Network and Physiology. *Physiological Reviews* 85:523–569.

Adkins DLD, Boychuk JJ, Remple MSM, Kleim JAJ. 2006. Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord. *J Appl Physiol* 101:1776–1782.

Aimone JB, Deng W, Gage FH. 2011. ScienceDirect.com - Neuron - Resolving New Memories: A Critical Look at the Dentate Gyrus, Adult Neurogenesis, and Pattern Separation. *Neuron* 70:589–596.

Aloisi F. 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36:165–179.

Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335.

Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. 2001. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci* 14:10–18.

Bednarczyk MR, Hacker LC, Fortin-Nunez S, Aumont A, Bergeron R, Fernandes KJL. 2011. Distinct stages of adult hippocampal neurogenesis are regulated by running and the running environment. *Hippocampus* 21:1334–1347.

Bischofberger J, Engel D, Frotscher M, Jonas P. 2006. Timing and efficacy of transmitter release at mossy fiber synapses in the hippocampal network. *Pflugers Arch* 453:361–372.

Bishop NA, Lu T, Yankner BA. 2010. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464:529–535.

Botting RM. 2006. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *Journal of physiology and pharmacology* 57 Suppl 5:113-24.

Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW. 2002. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* 125:1297–1308.

Bunsey M, Eichenbaum H. 1996. Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature* 379:255–257.

Cajal SRY. 1928. *Degeneration & Regeneration of the Nervous System*, London: Oxford Univ. Press.

Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337–344.

D'Hooge R, De Deyn PP. 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 36:60–90.

- Deng W, Aimone JB, Gage FH. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339–350.
- Drapeau E. 2003. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:14385–14390.
- Duvernoy HM. 2005. *The human hippocampus: functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI*, Berlin. Springer-Verlag.
- Ekdahl CT, Claassen J-H, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. 2003. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13632–13637.
- Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. 2009. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 158:1021–1029.
- Ekdahl CT. 2012. Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Front Pharmacol* 3:41.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn A-M, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* 4:1313–1317.
- Fagan SC, Waller JL, Nichols FT, Edwards DJ, Pettigrew LC, Clark WM, Hall CE, Switzer JA, Ergul A, Hess DC. 2010. Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study. *Stroke* 41:2283–2287.
- Geibig CS, Keiner S, Redecker C. 2012. Functional recruitment of newborn hippocampal neurons after experimental stroke. *Neurobiol Dis* 46:431–439.
- Ghandour MS, Derer P, Labourdette G, Delaunoy JP, Langley OK. 1981. Glial cell markers in the reeler mutant mouse: a biochemical and immunohistological study. *J Neurochem* 36:195–200.
- Goldstein LB. 2008. Minocycline treatment in acute stroke. *Curr Atheroscler Rep* 10:286–287.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A. 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci.* 2:260-265.
- Greene-Schloesser D, Robbins ME. 2012. Radiation-induced cognitive impairment- from bench to bedside. *Neuro Oncol* 14:iv37–iv44.
- Hoehn BD, Palmer TD, Steinberg GK. 2005. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke* 36:2718–2724.
- Intlekofer KA, Cotman CW. 2013. Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 57:47-55.

- Keiner S, Wurm F, Kunze A, Witte OW, Redecker C. 2008. Rehabilitative therapies differentially alter proliferation and survival of glial cell populations in the perilesional zone of cortical infarcts. *Glia* 56:516–527.
- Kempermann G, Fabel K, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Garthe A, Wolf SA. 2010. Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity. *Front Neurosci* 4:189.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493–495.
- Kempermann G. 2002. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Neuroscience* 22:635–638.
- Kempermann GG. 2012. Physical activity and brain function. *Internist, Berlin* 53:698–704.
- Kim BJ, Kim M-J, Park J-M, Lee SH, Kim Y-J, Ryu S, Kim YH, Yoon B-W. 2009. Reduced neurogenesis after suppressed inflammation by minocycline in transient cerebral ischemia in rat. *Journal of the Neurological Sciences* 279:70–75.
- Kim H-S, Suh Y-H. 2009. Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res* 196:168–179.
- Kim S-SS, Kong P-JP, Kim B-SB, Sheen D-HD, Nam S-YS, Chun WW. 2004. Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E2 in BV2 microglial cells. *Arch Pharm Res* 27:314–318.
- Kluska MM, Witte OW, Bolz J, Redecker C. 2005. Neurogenesis in the adult dentate gyrus after cortical infarcts: effects of infarct location, N-methyl-D-aspartate receptor blockade and anti-inflammatory treatment. *Neuroscience* 135:723–735.
- Kohman RA, DeYoung EK, Bhattacharya TK, Peterson LN, Rhodes JS. 2012. Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. *Brain Behav Immun* 26:803–810.
- Kramer AF, Erickson KI, Colcombe SJ. 2006. Exercise, cognition, and the aging brain. *J Appl Physiol* 101:1237–1242.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *Journal of Neuroscience* 16:2027–2033.
- Kunze A, Grass S, Witte OW, Yamaguchi M, Kempermann G, Redecker C. 2006. Proliferative response of distinct hippocampal progenitor cell populations after cortical infarcts in the adult brain. *Neurobiol Dis* 21:324–332.
- Laplagne DA, Espósito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF. 2006. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *Plos Biol* 4:e409.

- Liebigt S, Schlegel N, Oberland J, Witte OW, Redecker C, Keiner S. 2012. Effects of rehabilitative training and anti-inflammatory treatment on functional recovery and cellular reorganization following stroke. *Exp Neurol* 233:776–782.
- Liu Z, Fan Y, Won SJ, Neumann M, Hu D, Zhou L, Weinstein PR, Liu J. 2007. Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. *Stroke* 38:146–152.
- Lledo P-M, Alonso M, Grubb MS. 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179–193.
- Luo CX, Jiang J, Zhou QG, Zhu XJ, Wang W, Zhang ZJ, Han X, Zhu DY. 2007. Voluntary exercise-induced neurogenesis in the postischemic dentate gyrus is associated with spatial memory recovery from stroke. *J Neurosci Res* 85:1637–1646.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. 2000. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405:951–955.
- Matsukawa N, Yasuhara T, Hara K, Xu L, Maki M, Yu G, Kaneko Y, Ojika K, Hess DC, Borlongan CV. 2009. Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke. *BMC Neurosci* 10:126.
- Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, Hen R. 2006. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci* 9:729–731.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD. 2003. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760–1765.
- Morrens J, Van Den Broeck W, Kempermann G. 2011. Glial cells in adult neurogenesis. *Glia* 60:159–174.
- Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47–60.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201–211.
- Neumann J. 2006. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *The FASEB Journal* 20:714-716.
- Niv F, Keiner S, Krishna K, Witte OW, Lie DC, Redecker C. 2012. Aberrant neurogenesis after stroke: a retroviral cell labeling study. *Stroke* 43:2468–2475.
- Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD. 2005. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:654–665.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 17:3727–3738.

- Parent JM. 2007. Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog Brain Research* 163:529-540.
- Platz T, van Kaick S, Möller L, Freund S, Winter T, Kim I-H. 2005. Impairment-oriented training and adaptive motor cortex reorganisation after stroke: a fTMS study. *J Neurol* 252:1363–1371.
- Platz T, Winter T, Müller N, Pinkowski C, Eickhof C, Mauritz KH. 2001. Arm ability training for stroke and traumatic brain injury patients with mild arm paresis: a single-blind, randomized, controlled trial. *Arch Phys Med Rehabil* 82:961–968.
- Raber J, Fan Y, Matsumori Y, Liu Z, Weinstein PR, Fike JR, Liu J. 2004. Irradiation attenuates neurogenesis and exacerbates ischemia-induced deficits. *Ann Neurol* 55:381–389.
- Redecker C, Wang W, Fritschy J-M, Witte OW. 2002. Widespread and long-lasting alterations in GABA(A)-receptor subtypes after focal cortical infarcts in rats: mediation by NMDA-dependent processes. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1463–1475.
- Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM. 2011a. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472:466-477.
- Sahay A, Wilson DA, Hen R. 2011b. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron* 70:582–588.
- Sasaki T, Kitagawa K, Sugiura S, Omura-Matsuoka E, Tanaka S, Yagita Y, Okano H, Matsumoto M, Hori M. 2003. Implication of cyclooxygenase-2 on enhanced proliferation of neural progenitor cells in the adult mouse hippocampus after ischemia. *J Neurosci Res* 72:461–471.
- Schmidt A, Hoppen M, Strecker J-K, Diederich K, Schäbitz W-R, Schilling M, Minnerup J. 2012. Photochemically induced ischemic stroke in rats. *Exp Transl Stroke Med* 4:13.
- Schroeter M, Jander S, Witte OW, Stoll G. 1999. Heterogeneity of the microglial response in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 89:1367–1377.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M. 2002. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12:578-584.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJP, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7:483–495.
- Snyder JS, Kee N, Wojtowicz JM. 2001. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol* 85:2423–2431.
- Stirling DP, Koochesfahani KM, Steeves JD, Tetzlaff W. 2005. Minocycline as a neuroprotective agent. *Neuroscientist* 11:308–322.

- Stoll G, Jander S, Schroeter M. 1998. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 56:149–171.
- Suzuki WA, Clayton NS. 2000. The hippocampus and memory: a comparative and ethological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 10:768–773.
- Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS. 1992. BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. *J Neurocytol* 21:185–197.
- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH. 2006. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442:929–933.
- Thored P, Heldmann U, Gomes-Leal W, Gisler R, Darsalia V, Taneera J, Nygren JM, Jacobsen S-EW, Ekdahl CT, Kokaia Z, et al. 2009. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia* 57:835–849.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266–270.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030–1034.
- Wake H, Moorhouse AJ, Miyamoto A, Nabekura J. 2012. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci* 36:209–217.
- Walter J, Keiner S, Witte OW, Redecker C. 2010. Differential stroke-induced proliferative response of distinct precursor cell subpopulations in the young and aged dentate gyrus. *Neuroscience* 169:1279–1286.
- Walter J, Keiner S, Witte OW, Redecker C. 2011. Age-related effects on hippocampal precursor cell subpopulations and neurogenesis. *Neurobiol Aging* 32:1906–1914.
- Watson BD, Dietrich WD, Prado R, Green BA. 1988. Photochemically induced vascular thrombosis (photothrombosis): Central nervous system consequences and clinical possibilities. *Neural Development and Regeneration* 22:507–524.
- Wolf SA, Steiner B, Akpinarli A, Kammertoens T, Nassenstein C, Braun A, Blankenstein T, Kempermann G. 2009. CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. *J Immunol* 182:3979–3984.
- Wurm F, Keiner S, Kunze A, Witte OW, Redecker C. 2007. Effects of skilled forelimb training on hippocampal neurogenesis and spatial learning after focal cortical infarcts in the adult rat brain. *Stroke* 38:2833–2840.
- Xu L, Fagan SC, Waller JL, Edwards D, Borlongan CV, Zheng J, Hill WD, Feuerstein G, Hess DC. 2004. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *BMC Neurol* 4:7.

Yrjänheikki JJ, Tikka TT, Keinänen RR, Goldsteins GG, Chan PHP, Koistinaho JJ. 1999. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13496–13500.

Yu T-S, Zhang G, Liebl DJ, Kernie SG. 2008. Traumatic brain injury-induced hippocampal neurogenesis requires activation of early nestin-expressing progenitors. *J Neurosci* 28:12901–12912.

Zhao C, Wang J, Zhao S, Nie Y. 2009. Constraint-induced movement therapy enhanced neurogenesis and behavioral recovery after stroke in adult rats. *Tohoku J Exp Med* 218:301–308.

Zhao R, Zhou J, Koschny T, Economou E, Soukoulis C. 2010. Zhao et al. Reply. *Phys Rev Lett* 105:189302.

Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. 2006. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9:268–275.

## 9 Anhang

### 9.1 Lebenslauf

#### **Name**

Nadja Schlegel

#### **Geburtsdaten**

01. Dezember 1983 in Werdau, Sachsen, Deutschland

#### **Familiärer Status**

verlobt, eine Tochter (26. Juli 2007), ein Sohn (04. Juni 2011)

#### **Ausbildung**

08/1990 bis 08/1994	Grundschule Langenhessen
08/1994 bis 09/2002	Gymnasium "Alexander von Humboldt" Werdau (Abschlussnote: 1,7)
09/2002 bis 06/2010	Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Abschlussnote 2)

#### **Auszeichnungen**

04/2006 bis 03/2007	Forschungsstipendium des interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF Jena)
---------------------	--

#### **Berufliche Tätigkeiten**

seit 09/2012	Ärztin in Weiterbildung an der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, Universitätsklinikum Jena
04/2011 bis 08/2012	Mutterschutz und Elternzeit

07/2010 bis 04/2011	Assistenzärztin in der Klinik für Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Jena
06/2007 bis 10/2008	Mutterschutz und Elternzeit
seit 02/2006	Promotion „Einfluss von Minocyclin und Indometacin auf trainingsinduzierte Neurogenese nach experimentellen Schlaganfällen“, Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Jena

### **Veröffentlichungen**

- N. Schlegel, S. Liebigt, S. Keiner, F. Niv, C. Redecker „Indometacin and Minocycline promote training-induced hippocampal neurogenesis after experimental stroke“ in process
- S. Liebigt, N. Schlegel, J. Oberland, O.W. Witte, C. Redecker, S. Keiner „Effects of rehabilitative training and anti-inflammatory treatment on functional recovery and cellular reorganization following stroke“ Exp Neurol. 2012 Feb;233(2):776-82.

## **8.2 Danksagung**

Diese Arbeit hätte nie als Dissertationsschrift anerkannt werden können, wenn ich nicht durch eine Reihe großartiger Menschen unterstützt worden wäre.

Großer Dank gilt vor allem meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Christoph Redecker, der dieses hochinteressante Forschungsgebiet für Jena erschlossen hat, mir ein Promotionsthema in diesem Bereich überlassen hat und mich umfassend fachlich und in klinischen Fragen beraten und unterstützt hat.

Ich danke Prof. Dr. med. O. W. Witte für die Bereitstellung von Arbeitsmitteln.

Sehr am Herzen liegt mir der Dank an meine Laborkollegen der Arbeitsgemeinschaft „Endogene neurale Stammzellen“. Insbesondere danke ich Dr. rer. nat. Silke Keiner, die mich zu jeder Zeit hilfreich beraten und unterstützt hat. Auch Dr. med. Fanny Niv, Dr. med. Albrecht Kunze, Dr. rer. nat. Josephine Walther, Dr. med. Christiane Geibig und Dr. med. Susan Liebig konnten mir in vielen Fragen helfen.

Benachbarte Arbeitsgruppen waren stets bereit Wissen und Technik zu teilen. An dieser Stelle konnte ich besonders von Dr. rer. nat. Marcel Knielings Beratung in Fragen Verhaltensbiologie und Umgang mit Ratten profitieren. Des Weiteren danke ich Dr. rer. nat. Anja Urbach und PhD Christian Schmeer für anregende fachliche Diskussionen und die gemeinsame Gestaltung eines „Journal Clubs“.

Für die hervorragende und sorgfältige technische Durchführung und Assistenz bei Experimenten möchte ich mich bei Julia Karius bedanken.

Außerdem gilt mein Dank für soziales Wohlfühl und angenehme Arbeitsatmosphäre Svetlana Tausch und Iwa Antonow-Schlorke, sowie allen genannten und nicht namentlich genannten Mitarbeitern der experimentellen Neurologie Jena.

Herzlicher Dank gilt meinem geduldigen Lebenspartner Dr. rer. nat. Jörg Petschulat für bereitwillige Unterstützung und Diskussion sowie EDV- Einsätze und Reparaturen. Ich danke meinen lieben Kindern, Mathilde und Arne, für abwechslungsreiche Unterhaltung und Zuwendung. Umfassender Dank gilt meinen engagierten Eltern für intensive mentale, finanzielle und beratende Unterstützung.

### **8.3 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller- Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Christoph Redecker, Dr. rer. nat. Silke Keiner und Dr. med. Susan Liebigt,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 30. September 2013

Nadja Schlegel

