

**Auswirkungen des Lebensalters auf die kortikale funktionale Inhibition
nach fokalen ischämischen Läsionen**

—

**elektrophysiologische und immunhistochemische
Untersuchungen an der Ratte**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)



vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Silvio Schmidt

1. Gutachter: Prof. Otto W. Witte (Jena)
2. Gutachter: Prof. Jürgen Bolz (Jena)
3. Gutachter: Prof. Erwin Speckmann (Münster)

Datum der öffentlichen Verteidigung: 01. August 2006

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	12
2.1 Photothrombose	12
2.2 Elektrophysiologische Methoden	14
2.3 Histologische Methoden	16
2.4 Statistische Auswertung	19
2.5 Verwendete Antikörper und Lösungen	20
3. Ergebnisse	25
3.1 Photothrombose	25
3.2 Elektrophysiologische Untersuchungen	25
3.3 Immunhistochemische Untersuchung des GABAergen Systems	34
3.4 Untersuchung der GFAP- und NeuN-Immunreaktivität	53
4. Diskussion	55
4.1 Diskussion der Untersuchungsmethoden	55
4.2 Diskussion der Ergebnisse	58
4.3 Schlussfolgerungen	70
5. Zusammenfassung	71
6. Abkürzungen	75
7. Literaturverzeichnis	76
8. Danksagung	92
9. Lebenslauf	93
10. Ehrenwörtliche Erklärung	94

1. EINLEITUNG

Demographische Entwicklung

Der rasante Fortschritt in Medizin und Technik hat in den letzten Jahrhunderten die Lebensumstände der Bevölkerung in den Industrienationen erheblich verbessert. Das führte zu einer deutlich erhöhten durchschnittlichen Lebenserwartung. Die Menschen erreichen höhere Alters- und die Gehirne neue und bisher unbekannte individuelle Entwicklungsstufen (Turner 2004). Gleichzeitig ist in den Industrienationen ein drastischer Geburtenrückgang zu verzeichnen. Das führt zu einer Überalterung der Gesellschaft (Abb.1). Somit stehen wir in Zukunft verstärkt altersabhängigen Krankheiten wie dem Schlaganfall gegenüber.

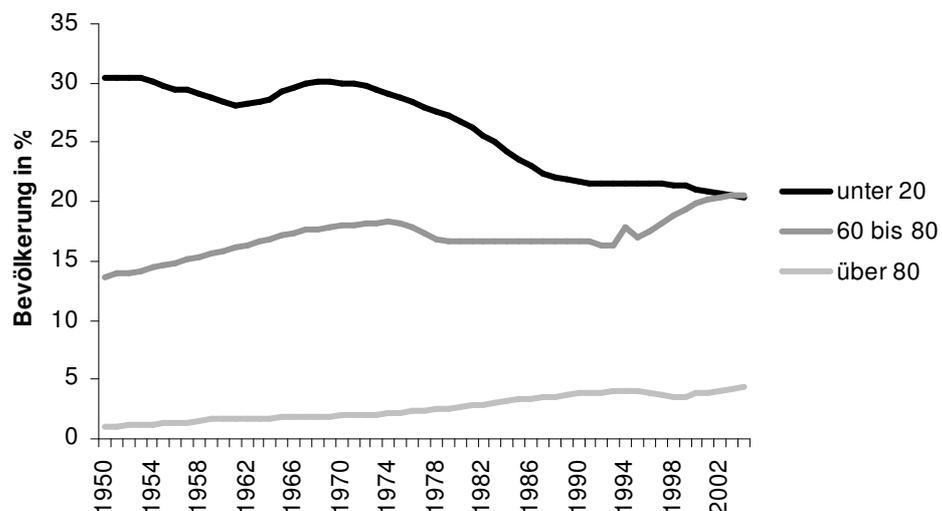


Abb. 1: Demographische Entwicklung in Deutschland. Die Darstellung der demographischen Entwicklung Deutschlands verdeutlicht die Alterung der Gesellschaft. In den letzten 50 Jahren ist der Anteil der unter 20 jährigen von 30 auf 20 % gefallen. Der Anteil der 60 bis 80 jährigen bzw. über 80 jährigen ist von 14 bzw. 1 % auf 21 bzw. 4 % gestiegen (www.destatis.de).

Dank der Fortschritte in der Medizin steigt die Anzahl der Überlebenden eines Schlaganfalls stetig an. Daraus resultiert eine starke Belastung des Gesundheitssystems und der Wirtschaft des Landes (Stosberg 2003). Gegenwärtig besteht zwischen den

Anstrengungen zur Prophylaxe und den Aufwendungen zur Rehabilitation ein Missverhältnis.

Häufigkeit und Ursachen des Schlaganfalls

Der Schlaganfall ist nach der koronaren Herzkrankheit und den malignen Tumoren die dritthäufigste Todesursache der über 60-jährigen in den Industriestaaten (Ramirez-Lassepas 1998). Die Inzidenz des Schlaganfalls steigt mit zunehmendem Alter (Feigin et al. 2003) (Abb. 2).

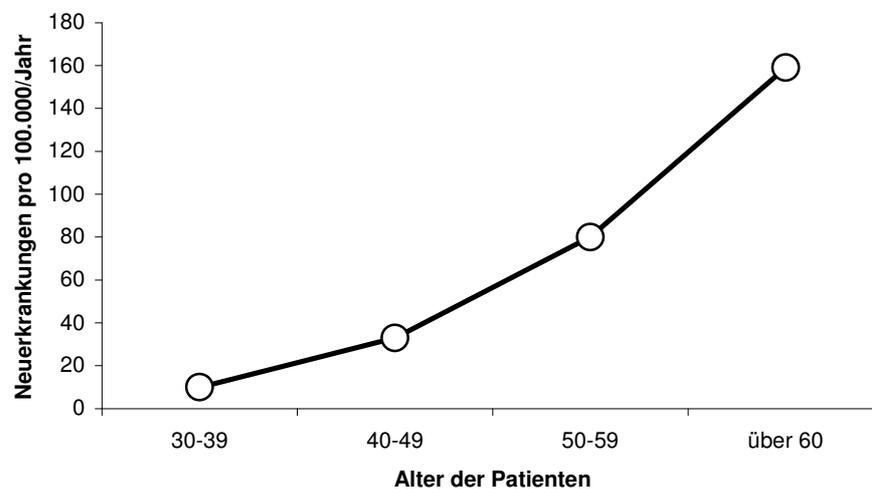


Abb. 2: Die Inzidenz des Schlaganfalls. In Deutschland beträgt die Inzidenz des Schlaganfalls 10 pro 100.000 Personen bei den 30 – 39-jährigen und 33, 80 bzw. 159 pro 100.000 Personen bei den 40 – 49, 50 – 59 bzw. den über 60-jährigen (www.destatis.de).

Der Schlaganfall ist eine hypoxisch bedingte Gehirnverletzung mit Unterbrechung der zerebralen Perfusion und plötzlich einsetzenden fokalneurologischen Defiziten. Diese Gehirnverletzung wird in etwa 20 % der Fälle durch eine intrazerebrale oder subarachnoidale Gefäßruptur als Folge von Aneurysmen oder arteriovenösen Fehlbildungen hervorgerufen (primär hämorrhagischer Infarkt). Die Blutungen können auch sekundär durch Thrombosen oder Embolien bedingt sein (sekundär hämorrhagischer Infarkt). In etwa 80 % der Fälle tritt ein ischämischer Infarkt infolge von arteriellen Durchblutungsstörungen auf (Fieschi et al. 1989). Die thrombotisch bedingte

Ischämie ist häufig durch arteriosklerotische Gefäßwandschäden der großen extrakraniellen hirnversorgenden Arterien (A. carotis interna und A. vertebralis) sowie der großen intrakraniellen Arterien (A. cerebri anterior, A. cerebri media, A. cerebri posterior und A. basilaris) verursacht (Makroangiopathie). Die Gefäßwandschäden kleinerer zerebraler Gefäße sind häufig durch den Diabetes mellitus oder den arteriellen Hypertonus bedingt (Mikroangiopathie). Weitere Auslöser für Durchblutungsstörungen können kardiale Embolien bei Vorhofflimmern oder Herzklappendefekten sowie paradoxe Embolien aufgrund eines Defektes am Vorhofseptum sein. Die Größe des ischämischen Infarktes hängt insbesondere vom Ausmaß und der Dauer der Mangel durchblutung ab. An die Pia mater cranialis grenzende neokortikale Infarktbezirke sind durch geringe piale Kollateralen besonders von einer zerebralen Blutflussreduktion betroffen (Hatashita et al. 1990).

Die Pathophysiologie des Schlaganfalls

Die ischämischen Schäden sind an der Entstehung eines heterogenen infarzierten Areals beteiligt. Im Zentrum des Infarktes treten bei zerebralen Blutflussraten um 20 % des Normalwertes irreversible strukturelle Schäden auf (Hossmann 1994). Die reduzierte Blutflussrate verursacht eine akute zerebrale Hypoxie und Glukosemangelversorgung und somit ein Versagen ATP-abhängiger Prozesse. Die transmembranalen Ionengradienten von Neuronen und Gliazellen brechen durch anoxische und permanente Depolarisationen zusammen (Katsura et al. 1994). Dieser Prozess wird als Exzitotoxizität bezeichnet. Durch das anabole Defizit mit dem Versagen der ATP-gesteuerten $[Na^+] / [K^+]$ Pumpen zeigt sich ein massiver Anstieg der extrazellulären $[K^+]$ Konzentration (Erecinska and Silver 1994). Daraus folgt die Membrandepolarisation präsynaptischer exzitatorischer Endigungen und die Aktivierung entsprechender spannungsabhängiger $[Ca^{2+}]$ Kanäle. Der resultierende Glutamatausstoß verstärkt die exzitatorische synaptische Transmission (Cousin et al. 1997). Durch den Energiemangel ist die Wiederaufnahme der exzitatorischen Aminosäuren verringert. Die daraus folgende Aktivierung von NMDA-

Rezeptoren, metabotropen Glutamatrezeptoren und spannungsabhängigen postsynaptischen Ionenkanälen bewirkt einen $[Na^+]$ Einstrom und eine Überladung der Zellen mit $[Ca^{2+}]$. Dem Ioneneinstrom folgt osmotisch Wasser. Die resultierende Zellschwellung beeinflusst als Ödem die Perfusion des umliegenden Gewebes negativ (Choi 1992). Die Zellschwellung verursacht durch Membranlecks weiteren intrazellulären $[Ca^{2+}]$ Einstrom und die Aktivierung mechanosensitiver Kationenkanäle (Sackin 1995). Die pathologische Erhöhung der intrazellulären Konzentration an $[Ca^{2+}]$ löst als „Second-Messenger-Kaskade“ zellschädigende Prozesse aus. Die $[Ca^{2+}]$ bedingte Aktivierung proteolytischer Enzyme leitet unter anderem eine Zytoskelettdegradation (Siman and Noszek 1988; Furukawa et al. 1997) sowie die Zerstörung von Proteinen der Extrazellulären Matrix ein (Chen and Strickland 1997). Die Generierung freier Radikale führt über proteolytische Prozesse und Lipidperoxidation zu Membranschäden (Gilgun-Sherki et al. 2002). Die Summe dieser Sekundärprozesse verursacht irreversible Zellschäden im Infarktzentrum und es folgt nekrotischer neuronaler, glialer und endothelialer Zelltod (van Lookeren Campagne and Gill 1996).

Am Rand des Infarktzentrum bildet sich eine Zone mit verminderter Blutflussrate bis auf 40 % des Normalwertes aber dennoch partiell stabilem Energiemetabolismus - die Penumbra - aus (Hossmann 1994; Back 1998). In diesem Gebiet treten repetitive Depolarisationen auf, denen gleiche Mechanismen wie im Läsionszentrum zugrunde liegen (Nedergaard and Astrup 1986; Hossmann 1996). Die Depolarisationen breiten sich in das nicht infarzierte Gewebe aus (Dietrich et al. 1994). Sie ähneln den von Leao (1944) beschriebenen „cortical spreading depressions“. Durch den starken metabolischen Stress sind die Depolarisationswellen für die Vergrößerung des Infarktkerns in die benachbarte Penumbra verantwortlich (Nedergaard 1996). Dabei korreliert die Anzahl der Depolarisationswellen mit der finalen Infarktgröße (Back et al. 1996). Solche Depolarisationswellen können verzögerte Apoptose- und Inflamationsprozesse in primär nicht infarziertem Gewebe aktivieren (Back et al. 2004).

Die Gewebnekrosen resultieren in Bewusstseinsstörungen, komatösen Zuständen, spastischen Hemiplegien oder Hemiparesen und verschiedenen motorischen, sensorischen sowie sensiblen Ausfallserscheinungen (Yamamoto and Magalong 2003). Bei 5 – 25 % der Schlaganfallpatienten werden Epilepsien beobachtet (Kotila and Waltimo 1992). Für die Ausbildung der Epilepsien kann die verstärkte Erregbarkeit ischämischer Gehirnnareale verantwortlich gemacht werden (Pohlmann-Eden et al. 1996; Rumbach 2004).

Zerebrale Plastizität

Das Gehirn ist in der Lage, ischämiebedingte funktionelle Ausfallserscheinungen teilweise oder vollständig zu regenerieren. Für die Funktionswiederkehr ist die Plastizität adulter neuronaler Systeme von grundlegender Bedeutung (Taub et al. 1993; Seitz et al. 2004; Ward 2005a). Die zerebrale Plastizität umfasst Veränderungen der Impulsverarbeitung zwischen Neuronen. Während der Embryonalentwicklung des Kortex wandern Neurone aus der Vorläuferzellschicht in die Hirnrinde ein. Dabei spielen Gliazellausläufer als Pionierfasern eine wesentliche Rolle. Es bildet sich eine Vielzahl synaptischer Verbindungen, von denen postnatal viele wieder getrennt werden (Darian-Smith et al. 1990; Huttenlocher and Dabholkar 1997). Es entwickelt sich ein grobes, genetisch determiniertes Netzwerk peripherer, subkortikaler und kortikaler Verschaltungen (O'Leary et al. 1994). Der sensible Homunkulus nach Penfield und Rasmussen (Penfield and Rasmussen 1950) zeigt beispielsweise nur einen Bruchteil der tatsächlichen neuronalen Verschaltungen. Die sensiblen Hirnkarten sind häufig ausgedehnter, unschärfer und überlappender als dargestellt. Eine Vielzahl sensomotorischer Neurone liegt außerhalb des parietalen Cortex (Nii et al. 1996). Diese weitläufigen Projektionen bilden die Grundlage für das Erlernen komplexer sensomotorischer Fähigkeiten, wie dem Spielen eines Saiteninstrumentes (Elbert et al. 1995) oder das Erlernen der Blindenschrift (Sterr et al. 1998). Die genetisch prädisponierte synaptische Verschaltung wird dabei durch entwicklungs- und erfahrungsbedingte Einflüsse reguliert und moduliert (Edelman 1993).

Dies trifft bei den Mammalia während der Entwicklung und im adulten Stadium zu. Somatosensibles Training einzelner Finger resultiert bei adulten Primaten in der Vergrößerung der entsprechenden kortikalen Repräsentation (Merzenich et al. 1983; Clark et al. 1988; Jenkins et al. 1990; Recanzone et al. 1992). Dagegen führt der Ausfall des somatosensiblen Inputs zur Verkleinerung des dazugehörigen Repräsentationsareals und zu einer Invasion benachbarter Areale (Pons et al. 1991; Elbert et al. 1994; Yang et al. 1994). Somit sind adulte Primaten zu einer erfahrungsbedingten zerebralen Reorganisation fähig.

Funktionserholung und zerebrale Reorganisation

Plastische Veränderungen des Gehirns werden im intakten Nervensystem beobachtet und sind an der Funktionserholung nach Schlaganfällen beteiligt. Beim Menschen können funktionsabhängige Aktivierungen definierter Gehirnareale durch nicht invasive Techniken wie die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT), die Positronenemissionstomographie (PET) und die transkranielle Magnetstimulation (TMS) untersucht werden (Baron et al. 2004). Bei Schlaganfallpatienten mit Infarkten im primären motorischen Areal der Hand treten während Bewegung der betroffenen Hand in verschiedenen Gehirnarealen verstärkte funktionsabhängige Aktivitäten auf (Calautti and Baron 2003). Dabei besteht ein Zusammenhang mit dem Grad der postläsionalen Beeinträchtigung. Patienten mit schlechter Funktionserholung zeigen erstens bilaterale und zweitens weiter ausgedehnte funktionsabhängige Aktivierungen primärer und sekundärer motorischer Areale als Patienten mit guter Erholung, deren Aktivierungsmuster weitgehend dem von Kontrollpersonen entspricht. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass Funktionserholung am besten in den für die jeweilige Funktion ursprünglich angelegten Arealen stattfindet (Ward et al. 2003a, b; Cramer 2004). TMS-Untersuchungen zeigen aber die Beteiligung sekundärer motorischer Areale wie dem dorsolateralen prämotorischen Kortex (PMd) beider Gehirnhemisphären an der postläsionalen Performance einfacher Bewegungen der Hand (Johansen-Berg et al. 2002; Fridman et al.

2004). Die Aktivierung kontraläsionaler primärer motorischer Areale (M1) scheint die Bewegungsperformance der betroffenen Hand negativ zu beeinflussen (Murase et al. 2004). Es bleibt weiterhin unklar, inwieweit die Involvierung zusätzlicher Gehirnareale die Funktionserholung positiv beeinflusst. Postläsionale Gehirne weisen letztendlich eine reorganisierte funktionelle Struktur auf, deren individuelle Ausbildung maßgeblich von der Lage und Anatomie der Läsion sowie vom Alter des Patienten beeinflusst wird (Seitz et al. 2004; Ward 2005a).

Zerebrale Reorganisationsmechanismen

An der ischämisch bedingten zerebralen Reorganisation sind verschiedene Formen der Plastizität parallel beteiligt. Es kann zwischen einer a) passiven Anpassung des Gehirns aufgrund gestörter neuronaler Netzwerke, b) Reorganisation aufgrund spontaner Regeneration von geschädigtem Gehirngewebe, c) Reorganisation aufgrund läsionsbedingter Verhaltensänderungen und d) Reorganisation aufgrund therapeutischer Interventionen differenziert werden (Liepert and Weiller 2003). Diese Prozesse sind unter anderem von einer veränderten intrakortikalen Inhibition in der geschädigten (Liepert et al. 2000b; Manganotti et al. 2002; Cicinelli et al. 2003) und in der intakten Hemisphäre begleitet (Liepert et al. 2000a; Manganotti et al. 2002; Shimizu et al. 2002; Butefisch et al. 2003), welche die kortikale Erregbarkeit beeinflussen könnte. TMS-induzierte Stimulationen prä- und postsynaptischer Prozesse bewirken Veränderungen der kortikalen Erregbarkeit und begünstigen verschiedene motorische Trainingsprozesse (Uy et al. 2003; Butefisch et al. 2004). Daher könnte das Gehirn durch die Modulation inhibitorischer Systeme für plastische Veränderungen „konditioniert“ sein (Ward 2005b).

Für die detaillierte Untersuchung läsionsinduzierter zerebraler Plastizität stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung (Hossmann 1998; Traystman 2003). In diesen Modellen können Funktionsstörungen und zerebrale Reorganisation mit infarzierten Gehirnarealen in Verbindung gebracht werden (Kozlowski et al. 1996; Frost et al. 2003;

Reinecke et al. 2003; Biernaskie et al. 2005). fMRT-Untersuchungen an läsierten Ratten unterstreichen Parallelen zwischen Patienten und Tiermodellen. Nach Okklusion der A. cerebri media („middle cerebral artery occlusion“, MCAO) wurden bilaterale funktionsabhängige Aktivierungen registriert, die sich mit zunehmender Funktionserholung wieder auf Kontrollniveau einstellten (Dijkhuizen et al. 2001). Im Umfeld fokaler photothrombotisch induzierter kortikaler Läsionen tritt eine lang anhaltende neuronale Übererregbarkeit auf, die auf einer veränderten Bindungseigenschaft oder Expression von GABA_A-Rezeptoren beruhen könnte (Schiene et al. 1996). Intrazelluläre Untersuchungen bestätigen die Reduktion der GABA vermittelten Inhibition in diesen Arealen (Neumann-Haefelin et al. 1995). Die verminderte GABAerge Inhibition und die verstärkte neuronale Erregbarkeit können die neuronale Reorganisation begünstigen und für die Umstrukturierung läsiionsangrenzender kortikaler Areale verantwortlich sein (Schiene et al. 1999). Die GABAerge Inhibition vermittelt die scharfe Abgrenzung kortikaler Areale (Jones 1993; Hensch and Stryker 2004). Funktionelle Untersuchungen an Ratten und Katzen belegen, dass eine Verminderung der GABAergen Inhibition die „Demaskierung“ stiller Synapsen ermöglicht und an der Modifikation kortikaler Repräsentationen beteiligt ist (Dykes et al. 1984; Alloway et al. 1989; Jacobs and Donoghue 1991). Die Modulation synaptischer Effizienz in Form von assoziativer Langzeitpotenzierung (LTP) spielt bei der kortikalen Reorganisation eine bedeutende Rolle (Allard et al. 1991; Buonomano and Merzenich 1996; Wang et al. 1996). Funktionelle Experimente unterstreichen, dass inhibitorische Prozesse maßgeblich an LTP und Lernprozessen beteiligt sind. Die Hemmung GABAerger Inhibition mit Bicuculline fördert die Induktion von LTP im Kortex (Artola and Singer 1987) und begünstigt die Funktionserholung nach kortikalen Läsionen (Hernandez and Schallert 1988). Tatsächlich lässt sich LTP in läsiionsangrenzenden Arealen leichter als in Kontrollen induzieren (Hagemann et al. 1998). Es gibt deutliche Hinweise, dass die übererregbaren läsiionsangrenzenden Areale bei Ratten an der Funktionserholung beteiligt sind (Castro-Alamancos and Borrel 1995).

Läsionsbedingte Modulationen der GABAergen Inhibition sind nicht auf die Infarktumgebung beschränkt. Mit Hilfe der Doppelpulsstimulation zur Ableitung extrazellulärer Feldpotentiale in Gehirnschnitten konnten ausgedehnte Erregbarkeitsänderungen in der ipsi- und der kontralateralen Hemisphäre gezeigt werden (Domann et al. 1993; Buchkremer-Ratzmann et al. 1996; Reinecke et al. 1999). Bei Applikation von zwei aufeinanderfolgenden Reizen im Abstand von 20 Millisekunden ist die zweite Reizantwort kleiner als die erste Reizantwort. Das zeigt, dass der erste Reiz neben exzitatorischen auch inhibitorische Mechanismen auslöst und die zweite Antwort funktional inhibiert („funktionale Inhibition“). Mit dem gleichen Messparadigma wurde die entwicklungsbedingte Plastizität im visuellen Kortex der Ratte gezeigt. Im visuellen System korreliert die Ausbildung der funktionalen Inhibition mit dem Ende der kritischen Phase erfahrungsbedingter synaptischer Plastizität in Schicht II/III in der dritten Lebenswoche. Diese funktionale Inhibition ist durch die Aktivierung über GABA_A-Rezeptoren vermittelter inhibitorischer Schaltkreise in Schicht IV bedingt (Rozas et al. 2001). Die läsionsbedingte bilaterale Reduktion der Inhibition im Rattenkortex korreliert mit einer reduzierten Bindung von [3H]Muscimol an GABA_A-Rezeptoren (Qu et al. 1998; Que et al. 1999). Die reduzierte Rezeptorbindung kann durch den adaptiven Umbau des heteropentamer zusammengesetzten Rezeptors realisiert sein. Der Umbau des Rezeptors kann neben seinen Bindungseigenschaften auch seine Kanaleigenschaften ändern (Sigel et al. 1990; Sieghart 1995; Redecker et al. 2002).

Die hier dargestellten Mechanismen treffen bei Versuchstieren niedrigen Lebensalters zu. Sie führen zu dem Schluss, dass Gehirne niedrigen Lebensalters postläsional durch eine nachlassende intrakortikale Inhibition für plastische Veränderungen konditioniert werden, um eine Funktionserholung zu ermöglichen. Mammalia hohen Lebensalters unterscheiden sich in ihrer Anatomie, Physiologie, Neurobiochemie, ihrem Verhalten und der Reaktion auf einen Schlaganfall von denen niedrigen Lebensalters (Stein 2004). Der Glutamatspiegel und die Funktionalität der kortikalen NMDA-Rezeptoren zeigt sich bei

Ratten hohen Alters verändert (Fiore and Rampello 1989; Erdo and Wolff 1990; Gonzales et al. 1991; Wardas et al. 1997; Ossowska et al. 2001). Der Einfluss und die Funktionalität des GABAergen Systems wird mit zunehmendem Lebensalter ebenfalls moduliert (Komiskey et al. 1988; Turgeon and Albin 1994; Ruano et al. 1996; Ruano et al. 2000; Him et al. 2001; Vela et al. 2003).

Zielstellung der Untersuchung

Jedes kortikale Areal ist durch spezifische Merkmale charakterisiert. Inhibitorische Prozesse sind an der kortikalen Informationsverarbeitung und in starkem Maß an der Ausbildung und Abgrenzung kortikaler Areale beteiligt. Mit fortschreitendem Lebensalter vollzieht sich eine Modulation der physiologischen und morphologischen Eigenschaften des Gehirns. In dieser Studie soll untersucht werden, inwieweit derartige Veränderungen das inhibitorische System in verschiedenen kortikalen Arealen der Ratte betreffen.

Ein ischämischer Infarkt verändert den zerebralen Blutfluss und Metabolismus sowie die elektrophysiologische Aktivität in läsionsangrenzenden und in entfernt gelegenen Arealen. So wurden bei Ratten niedrigen Lebensalters nach kortikalen Infarkten weiträumige Erregbarkeitsänderungen sowie Modulationen des GABAergen Systems im ipsi- und kontralateralen Kortex beobachtet. Gehirne in fortgeschrittenem Alter reagieren aufgrund altersbedingter Modifikation anders als junge Gehirne auf einen Schlaganfall. In dieser Studie soll untersucht werden, welchen Einfluss das Lebensalter auf läsionsbedingte Veränderungen des inhibitorischen Systems hat.

Das inhibitorische System wurde elektrophysiologisch mittels der Doppelpulsstimulation zur Ableitung extrazellulärer Feldpotentiale in Gehirnschnitten von Ratten unterschiedlichen Lebensalters untersucht. Diese Methode erlaubt Aussagen über die durch GABA_A-Rezeptoren vermittelte funktionale Inhibition. Die Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ wurde immunhistochemisch untersucht.

Das Ischämiemodell der Photothrombose kam zum Einsatz, um vergleichende Untersuchungen von altersabhängigen Auswirkungen einer kortikalen Läsion durchzuführen. Dieses Modell erlaubt die nichtinvasive Induktion definierter ischämischer Läsionen im gewünschten kortikalen Areal.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen helfen, die Mechanismen altersbedingter und postläsionaler zerebraler Plastizität zu verstehen. Mit diesem Wissen ist es möglich, angemessene Therapiestrategien zur Rehabilitation nach einem Schlaganfall zu entwickeln.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Photothrombose

Für die Versuche verwendeten wir männliche Wistar-Ratten aus der Eigenzucht des Instituts für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die Tiere wurden im Standardkäfig unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen bei 22 – 24 °C Raumtemperatur, 60 – 80 % relativer Luftfeuchtigkeit, einem Tag-Nachtzyklus von 12 Stunden und freiem Zugang zu Wasser (pH 2,5 – 3,2) und Futter gehalten. Das Gewicht der adulten Tiere betrug 280 – 500 g. Alle Untersuchungen wurden unter Berücksichtigung des Tierversuchsgesetzes durchgeführt und erfolgten nach gültiger Tierversuchsgenehmigung.

Die Photothrombose wurde bei 3 Monate alten (niedriges Lebensalter) und 24 Monate (hohes Lebensalter) alten Tieren induziert. Diese wurden nach dem von Watson und Kollegen (1985) zugrunde liegenden Schema prozessiert (Abb. 3). Die Narkotisierung der Ratten erfolgte im Narkosetopf mit einem Gasgemisch von 3,5 % Isofluran (Curamed), 70 % Lachgas und 30 % Sauerstoff für 3 Minuten. Die Tiere wurden gewogen, rückseitig auf eine Heizmatte gelegt und mit Pflaster an den Extremitäten fixiert. Der weitere Narkoseverlauf konnte durch Beatmung mit einer Maske und Reduktion der Isoflurankonzentration auf 2,5 % aufrecht erhalten werden. Nach Rasur und Desinfektion des linken Leistenbereiches erfolgte die Freilegung der Vena femoralis sinistra auf einer Strecke von 10 – 15 mm. Die präparierte Region der Vene wurde mittels Catgut (3 metric, 3/0 VSP, Braun Melsungen) aufgespannt und mit einer Augenschere punktuell eröffnet. Mit Hilfe eines Venenhakens konnte ein mit 0,9 % Natriumchlorid gefüllter und luftleerer Polyethylenkatheter mit einem Außendurchmesser von 0.61 mm eingeführt werden. Die Blutaspiration ermöglichte die Kontrolle der korrekten Lage des Katheters. Nach der Fixation des Katheters mit Perma-Handseide (Ethicon) und dem Abbinden des

Venenstumpfes wurde die Ratte bauchseitig in eine Heizwanne gelegt und im Stereotakt fixiert. Die Körpertemperatur betrug konstant 37 °C. Nach der Rasur des Kopfes und der Präparation der Kalotte durch einen medianen Hautschnitt erfolgte die Freilegung der Punkte Bregma und Lambda, der Mittellinie und der rechten Schädelseite. Nach dem Vermessen der Kalotte konnte die Positionierung der Blende des Lichtleiters rechtsseitig 4 mm lateral der Mittellinie und mittig zwischen Bregma und Lambda vorgenommen werden. Bei den Tieren niedrigen Lebensalters betrug der Blendendurchmesser 1,5 mm und bei den Tieren hohen Lebensalters 2,4 mm. Der Lichtleiter wurde mit der Kaltlichtquelle (KL 1500, Schott) verbunden und diese bei Streulicht auf eine Lichtstärke von 4,5 eingestellt. Mit dem Start der Belichtung erfolgte innerhalb der ersten 30 Sekunden die intravenöse Injektion von etwa 400 µl Bengal Rosa (Sigma-Aldrich, Endkonzentration: 10 mg/kg Körpergewicht). Nach 20 Minuten Belichtung wurde der Katheter entfernt und der Leistenschnitt genäht. Die Kopfhaut wurde vernäht, die Narkose durch Gabe von 100 % Sauerstoff ausgeleitet und die läsionierten Tiere nach einer Erholungsphase in den Käfig zurückgesetzt. Die Behandlung der Kontrolltiere war mit Ausnahme der Belichtung der Kalotte identisch.

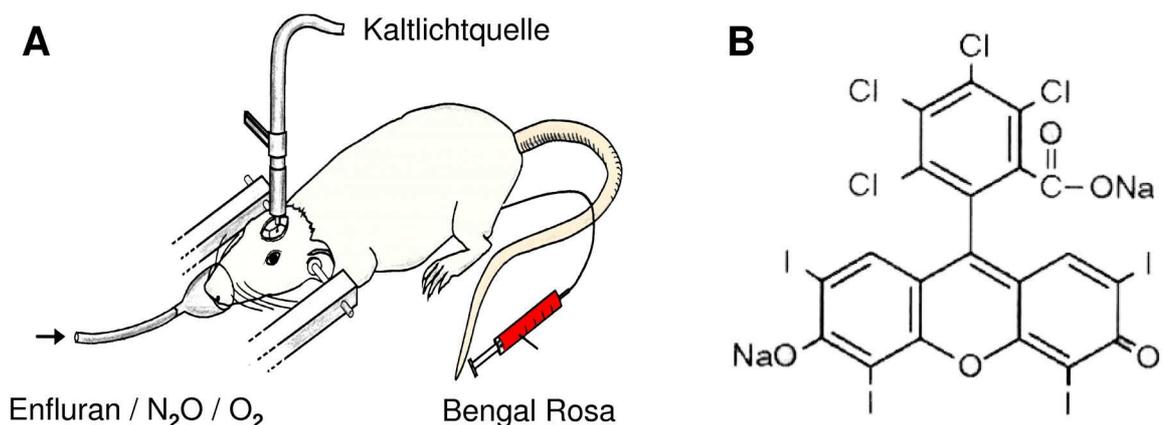


Abb. 3: Darstellung des Versuchsaufbaus zur photothrombotischen Induktion fokaler kortikaler Läsionen. A: Die Versuchstiere wurden mit einem Gasgemisch aus 2,5 % (V/V) Enfluran, 70 % Lachgas (N₂O) und 30 % Sauerstoff (O₂) narkotisiert und in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Die Belichtung der freigelegten Kalotte erfolgte durch eine Kaltlichtquelle über ein Lichtleiterkabel. Der photosensitive Farbstoff Bengal Rosa wurde in die Vena femoralis injiziert. Die Belichtung dauerte 20 Minuten. **B:** Strukturformel des Bengal Rosa, dessen Belichtung zur Bildung freier Radikale führt. Im Blutgefäßsystem verursacht diese Reaktion Endothelschädigung und Thrombozytenaggregation.

2.2 Elektrophysiologische Methoden

Anfertigung von nativen Gehirnschnitten

Die Tiere wurden mit Isofluran (Curamed) narkotisiert und anschließend dekapitiert. Die Kopfhaut konnte durch einen Medianschnitt von nasal nach kaudal durchtrennt und mitsamt der Muskulatur von der Kalotte getrennt werden. Es folgte die präparative Entfernung des Os occipitale, der Ossa parietalia, der Ossa frontalia und der Dura mater. Während der Präparation wurde das Gehirn mit gekühlter (4 °C) und Carbogen (95 % CO₂, 5 % O₂) begaster artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF) befeuchtet. Nach Durchtrennung der Hirnnerven und der Blutgefäße durch einen gebogenen Spatel erfolgte die Kühlung des Gehirns zur Vermeidung hypoxischer Schäden und zur Reduktion des Stoffwechsels in Carbogen-begaster ACSF (4 °C) für 1 Minute. Anschließend wurde das Gehirn auf mit ACSF befeuchtetem Filterpapier mittels einer entfetteten Rasierklinge für den Schneidevorgang getrimmt. Mit Blick auf die Dorsalseite des Gehirns konnten das Kleinhirn und das Vorderhirn durch frontalen Schnittverlauf abgetrennt und das resultierende Präparat auf die kaudale Seite gelegt werden. Es folgte die Abtrennung der basalen Anteile unterhalb der Fissura rhinalis. Zur Orientierung diente die von kranial nach kaudal verlaufende Arteria rhinalis. Der Gewebeblock wurde mit Cyanacrylatkleber (Pluradent) auf einen Kunststoffblock geklebt. Als Widerlager beim Schneidevorgang diente ein aufgeklebter Agar-Agar-Würfel. Mit einem Vibratom (Leica VT1000S) wurden frontale, 400 µm dicke Gehirnschnitte angefertigt und mittels einer weiten Pipette in die Messkammer überführt bzw. in einem Carbogen-begasten Vorratsgefäß bei Raumtemperatur gelagert. Die Schnittdicke von 400 µm gewährleistete die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen bis in die Mitte des Schnittes (Richards and McIlwain 1967).

Versuchsaufbau

Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden in einer Interface-Perfusionskammer nach Haas durchgeführt (Haas et al. 1979). Die Gehirnschnitte lagen auf Nylon-Netzen und wurden permanent mit auf 34 °C temperierter und Carbogen-begaster ACSF überspült (2 ml/min). In der Kammer wurde über die Oberfläche der Schnitte befeuchtetes und auf 34 °C temperiertes Carbogen geleitet. Dabei betrug die Temperatur in der Kammer 34 °C. Vor den elektrophysiologischen Untersuchungen equilibrierten die Schnitte für mindestens eine Stunde unter Abdeckung. Für die elektrische Stimulation der Schnitte kamen bipolare Reizelektroden aus Platin (Science Products, SNE-200, Spitzendurchmesser: 0.1 mm, Spitzenabstand: 0.25 mm) zum Einsatz. Die für die Stimulation benötigten Rechteckstimpulse wurden von einem Reizgenerator (Master 8 A.M.P.I.) generiert und die jeweils benötigte Reizintensität über einen Reizisolator (HG 106B, HI-Med England) eingestellt. Die Registrierung der extrazellulären Feldpotenziale erfolgte über 2 – 5 M Ω messende Glaskapillarelektroden. Diese mussten vor dem Versuch mit einem Horizontalpuller (Shutter Instruments, Modell P-87) aus Borosilikatglas (Science Products, GB 100F-8P) gezogen und mit ACSF gefüllt werden. Zur Ableitung diente eine Ag/AgCl-Brücke aus einem chlorierten Silberdraht in der Ableitelektrode und einer chlorierten silbernen Baderde. Die Elektroden wurden unter mikroskopischer Kontrolle und mit Hilfe von Mikromanipulatoren im Hirnschnittpräparat positioniert. Die Signale wurden mit einem Vor- und einem Nachverstärker 500 fach verstärkt und Hochpass gefiltert (0,1 Hz). Über einen Analog-Digital-Konverter (CED 1401) erfolgte die Übertragung der Messwerte auf den Computer. Zur Darstellung (Abtastrate: 10 kHz) diente das Programm „Signal“ (Cambridge Electronic Design, Version 1.0).

Generierung extrazellulärer Feldpotenziale und Doppelpulsstimulation

In den elektrophysiologischen Untersuchungen wurden Doppelpulse von jeweils 50 μ s Impulsdauer und 20 ms Interstimulusintervall appliziert. Es wurde mit einer schrittweise steigenden Reizintensität von jeweils 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Volt stimuliert. Das

Zeitintervall zwischen den einzelnen Doppelpulsen betrug 30 Sekunden. Die Stimulation erfolgte in Schicht VI am Übergang zur weißen Substanz an den in Abb. 4 gezeigten Positionen. Die Ableitung erfolgte in Schicht II/III der stimulierten kortikalen Kolumne.

Auswertung der Messergebnisse

Ein quantitatives Maß für die funktionale Inhibition konnte durch die Bildung des Quotienten aus der zweiten und der ersten Feldpotenzialantwort errechnet werden. Die Auswertung der Potenzialamplituden erfolgte am Computer unter Nutzung des Programms „Neuron“ (erstellt von Prof. Wadman, Amsterdam, NL). Die Amplitude der Feldpotenzialantworten ($fEPSP$) ergab sich aus der Differenz des maximalen Minimums der Antwort kurz nach dem Reiz und der maximalen Positivität nach dem maximalen Minimum (Abb. 5A). Für die Bildung der Quotienten ($fEPSP_2 / fEPSP_1$) wurden Feldpotenzialantworten aus dem maximalem Bereich verwendet. Ein Quotient kleiner als eins indiziert dabei eine Nettoinhibition des zweiten Reizes.

2.3 Histologische Methoden

Transkardiale Perfusion

Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mit Diethyläther (Fischar) im Äthertopf unter Kontrolle der Herzfrequenz. Nach dem Wiegen wurden die Tiere rückseitig in eine Plastikschaale gelegt und die Extremitäten mit Pflaster fixiert. Zur kontinuierlichen Narkose diente ein mit äthergetränktem Papiertuch bestücktes 50 ml Tube (Eppendorf), das über die Nase der Ratte gestülpt wurde. Durch einen Medianschnitt mit einer Schere konnte die Bauchdecke bis zum Processus xiphoideus des Sternum geöffnet werden. Nach beidseitiger Entfernung des Diaphragmas erfolgte die Durchtrennung der Rippen. Der Brustkorb wurde kopfwärts geklappt und mit einer chirurgischen Klemme fixiert. Zur Darstellung der Aorta wurde der Thymus verlagert. Das Herz wurde mit der chirurgischen Klemme gehalten und der Ventriculus sinister im Bereich der Herzspitze mit einem

Skalpelli punktiert. Über diese Öffnung konnte die Punktkanüle vom linken Ventrikel bis zum Eingang in die Aorta eingeführt und mittels Klemme fixiert werden. Nach der Perfusion des Tieres mit 70 ml Phosphat gepufferter Normalsalzlösung (PBS) folgte auf die Blutleere der Leber die Perfusion mit 350 ml 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung (4 % PFA) oder Zamboni-Lösung mittels einer Peristaltikpumpe (Heidolph, Pump drive PD5206) mit kontinuierlicher Fließgeschwindigkeit von 35 ml/min. Die Ratte wurde dekapitiert, das Gehirn freipräpariert und in 4 % PFA oder Zamboni-Lösung über Nacht bei 4 °C nachfixiert.

Kryoprotektion

Zur Gewährleistung des Frostschutzes lagerten die Gehirne bei 4 °C für 24 Stunden in 10 %iger- und anschließend für weitere 24 Stunden in 30 %iger Saccharoselösung. Die Gehirne wurden für 2 Minuten in 2-Methylbutan (Roth; mit Trockeneis auf -30 °C temperiert) eingefroren. Die Aufbewahrung der Gehirne erfolgte bei -80 °C.

Gefriermikrotomschnitte

Die Schnitte für immunhistochemische Untersuchungen wurden am Gefriermikrotom (Mikrom[®] HM400) angefertigt. Die Gehirne konnten mittels Tissue-Tek (Sakura) auf den Objektisch gefroren und innerhalb von 10 Minuten auf -43 °C temperiert werden. Die 50 µm dicken Schnitte wurden in PBS aufgefangen und weiterverarbeitet oder in Anti-Freeze-Lösung überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

Immunhistochemische Färbungen

Die Gehirne inkubierten zunächst für 12 Stunden bei Raumtemperatur in Natriumzitat-Lösung. Mit einer Rasierklinge wurde das Gehirn getrimmt und der Gewebekblock (Bregma 0 bis Bregma -6) in 80 ml Natriumzitat-Lösung in der Mikrowelle (135 Sekunden, 650 Watt) erhitzt (Antigen-Demaskierung). Am Gefriermikrotom konnten 50 µm dicke Schnitte angefertigt werden.

Nach dreimaligem Waschen der Schnitte in Tris-Triton (pH 7,4) folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper freischwimmend in Glasschalen (Ansätze und Antikörper siehe Tab. 1 unter 2.5) bei leichtem Schütteln über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Am folgenden Tag wurden die Schnitte dreimal in Tris-Triton (pH 7,4) gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit biotinylierten sekundären Antikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in Tris-Triton (pH 7,4) schloß sich die 30 minütige Inkubation in ABC-Reagenz (Linaris/Vectorlab) bei Raumtemperatur an. Es folgte die Peroxidasereaktion für 10 – 15 Minuten in DAB-Lösung (3,3-Diaminobenzidin) bei Raumtemperatur in Tris-Triton (pH 7,7). In dieser Reaktion überträgt die Meerrettichperoxidase des ABC-Komplexes (Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase) Elektronen vom DAB auf das H₂O₂, das dabei zu H₂O reduziert wird. Es resultiert eine oxidative Polymerisation und Zyklisierung des DAB, wobei ein dunkelbraunes, in Wasser und Ethanol unlösliches Phenazinpolymer entsteht. Die Schnitte wurden zweimal in Tris-Triton (pH 7,4) gewaschen und anschließend mittels 0,5 %iger Gelatine auf Objektträger übertragen. Nach Lufttrocknung von etwa einer Stunde konnten die Schnitte mit Entellan (Merck) eingedeckelt werden.

Nissl-Färbung

Zum Nachweis von strukturellen Veränderungen des Gehirngewebes wurde eine Nissl-Färbung mit Methyleneblau (Sigma) durchgeführt. Dieser basische Farbstoff färbt die ribosomale RNA speziell des rauhen endoplasmatischen Retikulums und markiert damit lebende Zellen. Dazu wurden die Schnitte mit 0,5 %iger Gelatine auf Objektträger übertragen und 3 Minuten in Methyleneblau-Lösung gefärbt. Nach Lufttrocknung für ca. eine Stunde konnten die Schnitte mit Entellan (Merck) eingedeckelt werden.

Auswertung der histologischen Präparate

Immunhistologisch und nach Nissl gefärbte Schnitte wurden mit dem Mikroskop Axioplan 2 (Zeiss) ausgewertet. Mit Hilfe der digitalen Kamera Axiocam (Zeiss) konnten

die Bilder auf den Computer übertragen und mit der Software Axio Vision (Zeiss) dargestellt werden. Für die semiquantitative Auswertung wurden die Schnitte auf einem helligkeitsstabilisierten Beleuchtungstisch mit einer CCD-Kamera (Hamamatsu) aufgenommen, das analoge Kamerasignal mit einem Video-Prozessor (Hamamatsu) verstärkt und mit einem MacIntosh digitalisiert. Mit Hilfe des Programms NIH-Image konnten die Schnitte in Falschfarbenkodierung (Farbskala: 1 – 256) dargestellt werden. Das ermöglicht die Messung der relativen optischen Dichte (ROD) und die semiquantitative vergleichende Auswertung der Immunreaktivität entsprechender Regionen mit dem Programm Microsoft Excel.

2.4 Statistische Auswertung

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Es wurde ein Gehirnschnitt pro Versuchstier in die jeweilige Auswertung einbezogen. Der Vergleich zwischen linker und rechter Hemisphäre bei den Kontrolltieren erfolgte nach dem Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben ($p < 0,05$). Der Vergleich zwischen Läsions- und Kontrolltieren erfolgte mit dem Student-t-Test für ungepaarte Stichproben ($p < 0,05$). Die Korrektur des α -Fehlers wurde mit dem Verfahren nach Bonferroni-Holm durchgeführt.

2.5 Verwendete Antikörper und Lösungen

Tab. 1: Für immunhistochemische Färbungen verwendete Antikörper und deren Ansätze.

Prim. Antikörper	Hersteller	Sek. Antikörper	Hersteller	Serum
GABA _A α1 (1 : 20.000) in Tris/Triton 0.2%	J.M. Fritschy	Goat anti Rabbit Biotinyliert (1 : 300)	Jackson	Normal Goat Serum in Tris/Triton 0.2%
GABA _A α2 (1 : 2000) in Tris/Triton 0.2%	J.M. Fritschy	Goat anti Rabbit Biotinyliert (1 : 300)	Jackson	Normal Goat Serum in Tris/Triton 0.2%
GABA _A α3 (1 : 2000) in Tris/Triton 0.2%	J.M. Fritschy	Goat anti Rabbit Biotinyliert (1 : 300)	Jackson	Normal Goat Serum in Tris/Triton 0.2%
GABA _A α5 (1 : 1000) in Tris/Triton 0.2%	J.M. Fritschy	Goat anti Rabbit Biotinyliert (1 : 300)	Jackson	Normal Goat Serum in Tris/Triton 0.2%
GABA _A γ2 (1 : 3000) in Tris/Triton 0.2%	J.M. Fritschy	Goat anti Rabbit Biotinyliert (1 : 300)	Jackson	Normal Goat Serum in Tris/Triton 0.2%
NeuN (1 : 500) in Tris/Triton 0.2%	Chemicon MAB-377	Horse anti Mouse (1 : 300)	Jackson	Normal Horse Serum in Tris/Triton 0.2%
GFAP (1 : 2000) in Tris/Triton 0.2%	Chemicon	Goat anti Rabbit Biotinyliert (1 : 500)	Jackson	Normal Goat Serum in Tris/Triton 0.2%

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität *zur Analyse* bzw. für *biochemische Zwecke* verwendet. Alle Lösungen wurden mit Nanopor-Wasser (USF Elga) angesetzt.

ACSF (artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit)

Diese Lösung ist vor jedem Versuch frisch anzusetzen, die Stammlösungen sind bei 4 °C einige Tage haltbar.

<u>Stammlösung I</u> (1000 ml)	Molarität in der Endlösung (mM)		
- NaCl	72,466 g	124	(Roth)
- KCl	2,237 g	3	(Merck)
- NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	1,275 g	1,25	(Merck)
<u>Stammlösung II</u> (500 ml)			
- CaCl ₂ * 2 H ₂ O	14,702 g	2	(Merck)
<u>Stammlösung III</u> (500 ml)			
- MgCl * 6 H ₂ O	20,330 g	2	(Roth)

Ansatz:

- Stammlösung I	200 ml		
- Stammlösung II	20 ml		
- Stammlösung III	20 ml		
- Glucose	3,964 g	10	(Merck)
- NaHCO ₃	3,612 g	22	(Merck)
- ad. 2000 ml			
- im Wasserbad auf 34 °C temperieren und mit Carbogen begasen			
- pH mit HCl auf 7,4 einstellen			(Merck)

Agar-Agar (als Widerlager bei der Gewebepreparation)

- ACSF	100 ml		
- Agar-Agar	5 g		(Merck)

- in Glaspetrischale geben und in der Mikrowelle (750 Watt) kurz aufkochen
- bei 4 °C einige Tage lagerbar

Bengal-Rosa

- 0,9%ige NaCl-Lösung 10 ml (Fresenius)
- Bengal Rosa 100 mg (Sigma)

Gelatine (0,5 %, zum Aufziehen der Schnitte)

- H₂O 200 ml
- Gelatine 1,0 g (Merck)
- Chrom-(III) Kaliumsulfat 0,1 g (Merck)
- auf 37 - 42°C erwärmen

Methylenblau

- H₂O 100 ml
- Methylenblau 0,020 g (Sigma)
- Na₂CO₃ * 10 H₂O 0,032 g (Merck)

PBS (Phosphat gepufferte Normalsalzlösung)

- Phosphatpuffer mit H₂O auf 0,1 M verdünnen und 0,9 % NaCl zufügen

PFA 4 % (Paraformaldehyd-Lösung zur transkardialen Perfusion)

- PBS mit 4 % Paraformaldehyd (Riedel-de-Häen)

Phosphatpuffer (0,2 M)

Stammlösung I (800 ml)

- Na₂HPO₄ * 2 H₂O 28,5 g (Merck)

Stammlösung II (300 ml)

Zitrat-PufferStammlösung I (500 ml)

- Zitronensäure 10,5 g (Riedel-de-Häen)

Stammlösung II (500 ml)

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 17,8 g (Merck)

Ansatz:

- Stammlösung I mit Stammlösung II auf pH 4,5 titrieren

3. ERGEBNISSE

3.1 Photothrombose

Alle Versuchstiere mit induzierter Photothrombose entwickelten eine kortikale Läsion. Die Untersuchungen erfolgten 7 Tage nach Läsionsinduktion. Auf der freipräparierten Gehirnoberfläche zeichnete sich ein scharf abgegrenztes und kreisrundes infarziertes Areal ab. Der Läsionsdurchmesser wurde an den präparierten Gehirnen vermessen und betrug bei der Versuchsgruppe niedrigen Lebensalters im Mittel $2,80 \pm 0,11$ mm ($n = 14$), bei der Versuchsgruppe hohen Lebensalters $2,98 \pm 0,15$ mm ($n = 12$) und zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die Läsion erstreckte sich über alle kortikalen Schichten und ließ das Corpus callosum intakt. Die kontralaterale Hemisphäre der läsierten Tiere und das Gehirngewebe der scheinoperierten Kontrolltiere zeigte makroskopisch, bei Ansicht durch das Vergrößerungsmikroskop in 10 facher Vergrößerung und lichtmikroskopisch nach Nissl-Färbung keine Strukturveränderungen (nicht gezeigt).

3.2 Elektrophysiologische Untersuchungen

In einer ersten Versuchsreihe wurde mit Hilfe der Doppelpulsstimulation die altersabhängige kortikale funktionale Inhibition nach Photothrombose untersucht. Es wurden Schnitte von 6 läsierten Tieren niedrigen Lebensalters und Schnitte von 5 läsierten Tieren hohen Lebensalters statistisch ausgewertet. Der Vergleich der Messergebnisse erfolgte mit Daten von 6 Kontrolltieren niedrigen Lebensalters bzw. von 4 Kontrolltieren hohen Lebensalters. Die Schnitte stammten aus der Region -3.5 – -3.8 relativ zu Bregma (Paxinos and Watson 1986). Die Feldpotenzialableitungen wurden in beiden Hemisphären an jeweils 8 Positionen durchgeführt. Die Messpositionen waren, wie in Abbildung 4 dargestellt, gleichmäßig über den Kortex verteilt. Diese entsprachen folgenden Arealen: okzipitaler Kortex (OX) für die Messpositionen 1 und 2,

sensomotorischer Kortex (SM) für die Messpositionen 3, 4 und 5 sowie auditorischer Kortex (AU) für die Messpositionen 6, 7 und 8 (Paxinos and Watson 1986).

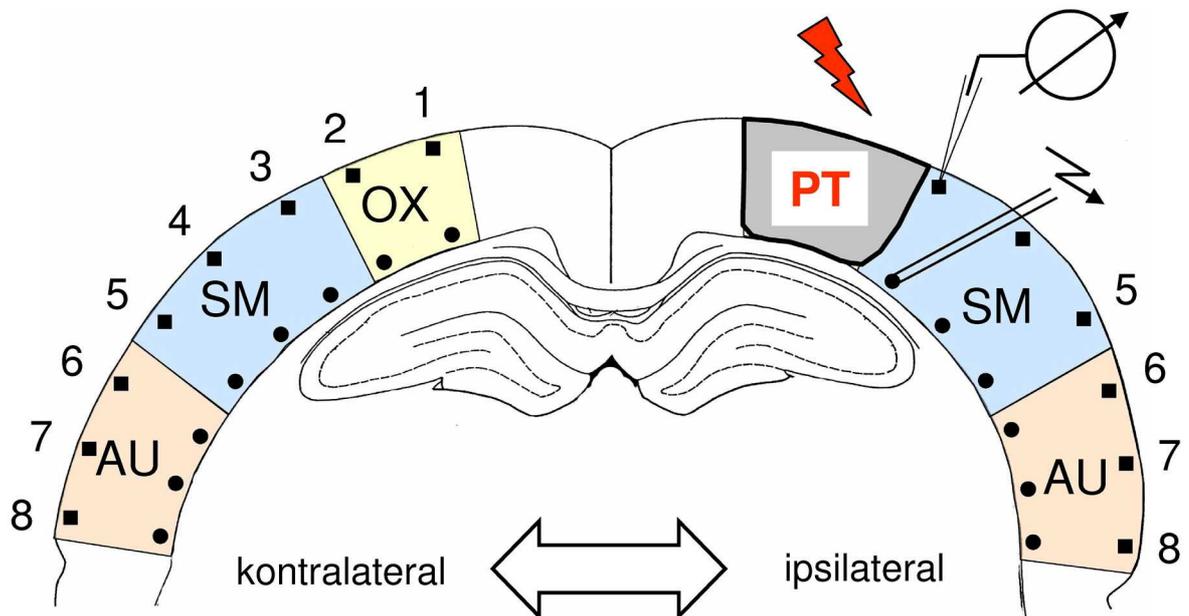


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Gehirnschnitts in der Frontalebene. Dargestellt ist die Positionierung der Elektroden und die Einteilung der kortikalen Areale, wie sie zur Auswertung der elektrophysiologisch und immunhistochemisch erhobenen Daten verwendet wurde. (PT: Photothrombose; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensomotorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; ● Position der Reizelektrode; ■ Position der Ableitelektrode).

Die Feldpotenziale wurden über Glasmikroelektroden abgeleitet, die unter mikroskopischer Kontrolle in Schicht II/III platziert wurden. Die bipolare Stimulationselektrode war in Schicht VI nahe der weißen Substanz in der gleichen Kolumne positioniert. Auf die Stimulation folgte nach einem positiven Stimulationsartefakt eine negative exzitatorische Feldpotenzialantwort, gefolgt von einem positiven Überschwinger. Die Feldpotenzialamplituden wurden aus der Potenzialdifferenz zwischen dem Maximum der negativen exzitatorischen Feldpotenzialantwort und dem Maximum des positiven Überschwingers ermittelt (Abb. 5A). Das Ausmaß der Antwort auf die erste Stimulation ($fEPSP_1$) folgte einer nichtlinearen Abhängigkeit von der Stimulationsintensität und zeigte mit ansteigender Reizstärke (10 – 60 Volt) in allen Versuchsgruppen einen Sättigungseffekt (nicht dargestellt). Zur Auswertung der funktionalen Inhibition wurden Feldpotenzialantworten aus dem Sättigungsbereich verwendet. Spontane Entladungen traten in keiner der Versuchsgruppen auf.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte in drei Präzisionsstufen. In der ersten Stufe wurden Mittelwerte aller Ableitpositionen gebildet. In der zweiten Stufe wurden die Messwerte aller Ableitpositionen einer Hemisphäre gemittelt und damit ein Gesamtmittelwert aller Versuchstiere gebildet. Die dritte Stufe bildete eine arealspezifische Auswertung. Dazu wurden die Messdaten der einzelnen Ableitpositionen mit Hilfe des Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos and Watson 1986) Kortexarealen zugeordnet und je Tier gemittelt. Aus diesen Werten wurde der arealspezifische Gesamtmittelwert aller Versuchstiere gebildet. Beim Vergleich der Messwerte der linken und rechten Hemisphäre der Kontrolltiere ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Messwerte der Kontrolltiere konnten daraufhin gepoolt werden.

Untersuchung der Kontrollgruppen

Die Feldpotenzialamplituden zeigten eine Abhängigkeit von der Messposition und vom Alter der Versuchstiere (Tab. 2). Dabei reagierten Kontrolltiere hohen Lebensalters mit etwa 30 % kleineren Antworten ($fEPSP_1$) auf den ersten Stimulus als Kontrolltiere niedrigen Lebensalters. Die $fEPSP_1$ betragen bei den Tieren niedrigen Lebensalters gemittelt über alle Messpositionen $2,33 \pm 0,11$ mV ($n = 6$) und waren bei den Tieren hohen Lebensalters mit $1,63 \pm 0,12$ mV ($n = 4$) signifikant kleiner ($p = 0,002$). Die über alle Messpositionen gemittelte zweite Feldpotenzialantwort ($fEPSP_2$) zeigte keine Differenz zwischen Tieren hohen ($1,19 \pm 0,11$ mV) und niedrigen Lebensalters ($1,18 \pm 0,06$ mV, Abb. 5B). Bei spezifischer Betrachtung der einzelnen Kortexareale verkleinerten sich die $fEPSP_1$ im sensomotorischen und auditorischen Kortex ($p = 0,011$ und $p = 0,024$). Bei Betrachtung der $fEPSP_2$ zeigten sich keine signifikanten arealspezifischen Unterschiede zwischen Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters (Tab. 3).

Tab. 2: Messpositionsbezogene Feldpotenzialantworten [mV] bei Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters (LA) auf den ersten ($fEPSP_1$) und den zweiten Stimulus ($fEPSP_2$) des Doppelpulses (Messpositionen siehe Abb. 4; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ Bonferroni-Holm korrigiert).

Position	$fEPSP_1$ niedriges LA	$fEPSP_1$ hohes LA	$fEPSP_2$ niedriges LA	$fEPSP_2$ hohes LA
1	2,48 \pm 0,21	2,21 \pm 0,28	1,67 \pm 0,23	1,81 \pm 0,32
2	2,39 \pm 0,26	1,86 \pm 0,36	1,39 \pm 0,14	1,36 \pm 0,27
3	2,39 \pm 0,15	1,67 \pm 0,33	0,84 \pm 0,11	1,23 \pm 0,21
4	2,37 \pm 0,18	1,25 \pm 0,17*	1,10 \pm 0,22	1,02 \pm 0,10
5	2,04 \pm 0,34	1,22 \pm 0,19	1,00 \pm 0,26	1,04 \pm 0,13
6	2,27 \pm 0,22	1,44 \pm 0,27	0,97 \pm 0,11	1,01 \pm 0,14
7	2,20 \pm 0,15	1,70 \pm 0,26	1,07 \pm 0,09	1,02 \pm 0,09
8	2,51 \pm 0,41	1,64 \pm 0,19	1,42 \pm 0,29	0,09 \pm 0,08

Tab. 3: Arealbezogene Feldpotenzialantworten [mV] bei Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters (LA) auf den ersten ($fEPSP_1$) und den zweiten Stimulus ($fEPSP_2$) nach Doppelpulsstimulation (Arealaufteilung siehe Abb. 4; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensomotorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ Bonferroni-Holm korrigiert).

Areal	$fEPSP_1$ niedriges LA	$fEPSP_1$ hohes LA	$fEPSP_2$ niedriges LA	$fEPSP_2$ hohes LA
Ox	2,43 \pm 0,21	2,03 \pm 0,22	1,53 \pm 0,17	1,59 \pm 0,22
SM	2,26 \pm 0,16	1,38 \pm 0,22*	0,98 \pm 0,14	1,10 \pm 0,14
Au	2,33 \pm 0,19	1,57 \pm 0,16	1,15 \pm 0,12	0,98 \pm 0,06

Die Quotienten der Feldpotenzialamplituden ($Q = fEPSP_2 / fEPSP_1$) zeigten eine Abhängigkeit von der Messposition und vom Lebensalter der Versuchstiere (Tab. 4). An den Positionen 3, 4 und 7 waren die Differenzen zwischen Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters signifikant. Gemittelt über alle Messpositionen betragen die Quotienten bei 3 Monate alten Kontrolltieren $0,51 \pm 0,03$ ($n = 6$). Die $fEPSP_2$ erreichten 51 % der $fEPSP_1$, was eine intakte kortikale funktionale Inhibition bei jungen Kontrolltieren indiziert. Bei den 24 Monate alten Kontrolltieren war der gemittelte Wert der Quotienten mit $0,74 \pm 0,01$ ($n = 4$) signifikant größer. Die Antwort auf den zweiten Reiz war bei Tieren hohen Lebensalters auf 74 % der ersten Antwort reduziert. Dies legt eine verminderte kortikale funktionale Inhibition bei Kontrolltieren hohen Lebensalters nahe. Die arealspezifische Auswertung zeigte bei Tieren hohen Lebensalters signifikant größere Quotienten im sensomotorischen (jung: $0,45 \pm 0,03$; alt: $0,83 \pm 0,06$, $p < 0,01$) und auditorischen Areal (jung: $0,49 \pm 0,02$; alt: $0,65 \pm 0,04$, $p < 0,01$; siehe Abb. 5C).

Tab. 4: Messpositionsbezogene Quotienten ($Q = fEPSP_2 / fEPSP_1$) bei Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters (LA; Messpositionen siehe Abb. 4; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ Bonferroni-Holm korrigiert).

Position	$fEPSP_2 / fEPSP_1$ niedriges LA	$fEPSP_2 / fEPSP_1$ hohes LA
1	0,68 \pm 0,10	0,81 \pm 0,06
2	0,61 \pm 0,08	0,73 \pm 0,04
3	0,35 \pm 0,04	0,77 \pm 0,07*
4	0,46 \pm 0,07	0,83 \pm 0,05*
5	0,53 \pm 0,10	0,87 \pm 0,06
6	0,43 \pm 0,02	0,72 \pm 0,06
7	0,49 \pm 0,05	0,62 \pm 0,05*
8	0,55 \pm 0,05	0,55 \pm 0,02

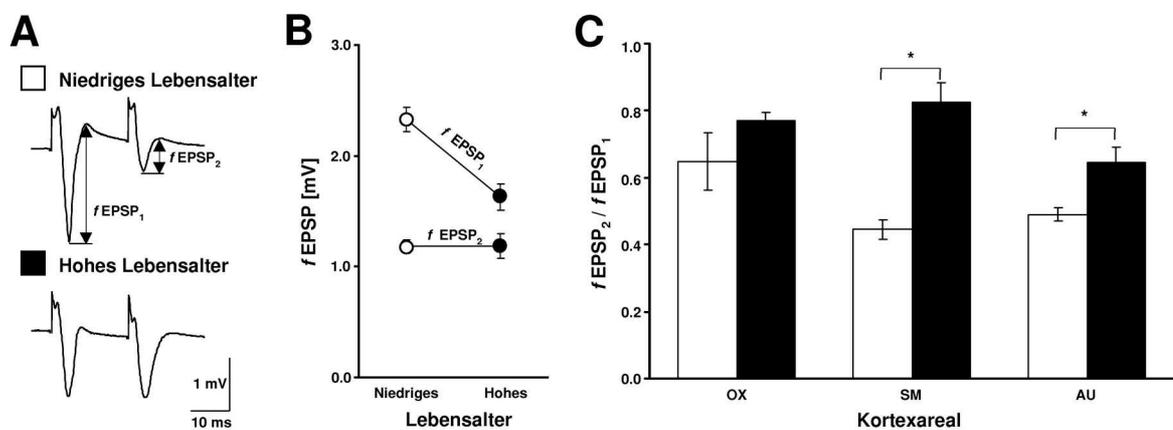


Abb. 5: Zusammenfassende Darstellung elektrophysiologischer Eigenschaften der Kontrolltiere. A: Beispiele extrazellulärer Feldpotenzialantworten $fEPSP_1$ und $fEPSP_2$ nach Doppelpulsstimulation an Messposition 4. Die Größe der Feldpotenzialantworten wurde aus der Potenzialdifferenz zwischen dem Maximum der negativen exzitatorischen Feldpotenzialauslenkung und dem Maximum des positiven Überschingers ermittelt **B:** Über alle Messpositionen gemittelte $fEPSP_1$ und $fEPSP_2$ bei Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters. Die Versuchstiere hohen Lebensalters reagieren im Vergleich zu den Versuchstieren niedrigen Lebensalters mit kleineren Feldpotenzialantworten auf den ersten Reiz der Doppelpulsstimulation. **C:** Mittlere Quotienten der Feldpotenzialamplituden ($Q = fEPSP_2 / fEPSP_1$) in den untersuchten kortikalen Arealen der Kontrolltiere niedrigen und hohen Lebensalters. Vergrößerte Quotienten bei den Versuchstieren hohen Lebensalters symbolisieren die Reduktion der funktionalen Inhibition im sensomotorischen und auditorischen Kortex. (Arealaufteilung siehe Abb. 4; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensomotorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ Bonferroni-Holm korrigiert)

Altersabhängige Reaktion auf einen fokalen kortikalen Infarkt

Bei den Tieren niedrigen Lebensalters (n=6) wurden lateral der Läsion verkleinerte Feldpotenzialamplituden ($fEPSP_1$) nach dem ersten Reiz der Doppelpulsstimulation gemessen (Tab. 5). Im Gesamtmittel sanken die $fEPSP_1$ in der ipsilateralen Hemisphäre um etwa 30 % auf $1,68 \pm 0,19$ mV ($p < 0,05$). In der kontralateralen Hemisphäre sanken die entsprechenden Gesamtmittel um etwa 18 % auf $1,94 \pm 0,21$ mV. An der Messposition

4 in unmittelbarer Nähe zur Läsion waren die $fEPSP_1$ mit $1,56 \pm 0,21$ mV kleiner als bei den Kontrollen ($2,37 \pm 0,18$ mV, $p < 0,05$). Die $fEPSP_2$ schwankten in der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre geringfügig um die Kontrollwerte (Tab. 5). Die arealspezifische Auswertung der Feldpotenzialamplituden ist in Abb. 6 dargestellt.

Tab. 5: Messpositionsbezogene Feldpotenzialantworten [mV] bei läsierten Tieren niedrigen Lebensalters auf den ersten ($fEPSP_1$) und den zweiten Stimulus ($fEPSP_2$) nach Doppelpulsstimulation ipsi- und kontralateral der Photothrombose im Vergleich mit den Kontrollwerten (Messpositionen siehe Abb. 4; Mittelwerte \pm SEM).

Position	$fEPSP_1$ Kontrolle	$fEPSP_1$ ipsi	$fEPSP_1$ kontra	$fEPSP_2$ Kontrolle	$fEPSP_2$ ipsi	$fEPSP_2$ kontra
1	$2,48 \pm 0,21$		$2,00 \pm 0,27$	$1,67 \pm 0,23$		$1,33 \pm 0,25$
2	$2,39 \pm 0,26$		$2,12 \pm 0,26$	$1,39 \pm 0,14$		$1,21 \pm 0,20$
3	$2,39 \pm 0,15$		$2,16 \pm 0,29$	$0,84 \pm 0,11$		$1,44 \pm 0,13$
4	$2,37 \pm 0,18$	$1,56 \pm 0,21$	$1,73 \pm 0,28$	$1,10 \pm 0,22$	$0,93 \pm 0,13$	$0,98 \pm 0,15$
5	$2,04 \pm 0,34$	$1,42 \pm 0,20$	$1,60 \pm 0,22$	$1,00 \pm 0,26$	$0,89 \pm 0,08$	$0,94 \pm 0,13$
6	$2,27 \pm 0,22$	$1,74 \pm 0,29$	$1,94 \pm 0,33$	$0,97 \pm 0,11$	$1,22 \pm 0,17$	$1,19 \pm 0,26$
7	$2,20 \pm 0,15$	$1,69 \pm 0,25$	$1,96 \pm 0,54$	$1,07 \pm 0,09$	$1,26 \pm 0,17$	$1,21 \pm 0,31$
8	$2,51 \pm 0,41$	$2,37 \pm 0,41$	$2,03 \pm 0,42$	$1,42 \pm 0,29$	$1,64 \pm 0,26$	$1,27 \pm 0,26$

Bei den läsierten Tieren niedrigen Lebensalters ($n=6$) stiegen die gemittelten Quotienten der Feldpotenzialamplituden ($Q = fEPSP_2 / fEPSP_1$) in der ipsilateralen Hemisphäre signifikant an ($0,69 \pm 0,05$; $p < 0,01$). In der kontralateralen Hemisphäre stiegen die Quotienten auf $0,61 \pm 0,05$. Die ipsilaterale Veränderung zeigte sich besonders deutlich an Messposition 6 in 3 – 4 mm Entfernung zum Rand der Läsion im auditorischen Areal. Der Quotient der Feldpotenzialamplituden stieg von $0,43 \pm 0,02$ signifikant auf $0,73 \pm 0,07$ ($p < 0,01$). Die Messpositionen 4, 5, 7 und 8 zeigten tendenziell vergrößerte Quotienten (Tab. 6). In der kontralateralen Hemisphäre verkleinerten sich die Quotienten an den Positionen 1 und 2 homotop zur Läsion und vergrößerten sich an den Positionen 3, 4, 5, 6, 7 und 8 (Tab. 6). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei den arealspezifischen Mittelwerten. Die für den ipsilateralen auditorischen Kortex gemittelten Quotienten stiegen signifikant auf $0,74 \pm 0,05$ an ($p < 0,01$). In Abb. 7 sind die

arealspezifischen prozentualen Veränderungen der Amplitudenquotienten der läsierten Tiere niedrigen Lebensalters im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen graphisch dargestellt.

Tab. 6: Messpositionsbezogene Quotienten ($Q = fEPSP_2 / fEPSP_1$) bei läsierten Tieren niedrigen Lebensalters ipsi- und kontralateral der Photothrombose im Vergleich mit den Kontrollwerten (Messpositionen siehe Abb. 4; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ Bonferroni-Holm korrigiert).

Position	$fEPSP_2 / fEPSP_1$ Kontrolle	$fEPSP_2 / fEPSP_1$ ipsilateral	$fEPSP_2 / fEPSP_1$ kontralateral
1	0,68 \pm 0,10		0,64 \pm 0,04
2	0,61 \pm 0,08		0,57 \pm 0,06
3	0,35 \pm 0,04		0,55 \pm 0,05
4	0,46 \pm 0,07	0,63 \pm 0,08	0,62 \pm 0,10
5	0,53 \pm 0,10	0,67 \pm 0,09	0,61 \pm 0,07
6	0,43 \pm 0,02	0,73 \pm 0,07*	0,61 \pm 0,08
7	0,49 \pm 0,05	0,77 \pm 0,09	0,63 \pm 0,07
8	0,55 \pm 0,05	0,68 \pm 0,07	0,64 \pm 0,07

Bei den läsierten Tieren hohen Lebensalters (n=5) zeigten sich lateral zur Läsion keine Veränderungen der $fEPSP_1$. Im kontralateralen Kortex war eine tendenzielle Verkleinerung der gemittelten $fEPSP_1$ auf $1,36 \pm 0,18$ mV zu beobachten (Tab. 7). Die $fEPSP_2$ zeigten lateral der Läsion im sensomotorischen Kortexareal eine Verkleinerung auf $0,63 \pm 0,13$ mV ($p < 0,05$; Abb. 6). Im kontralateralen Kortex zeigten die $fEPSP_2$ im Gesamtmittel eine tendenzielle Verkleinerung auf $0,98 \pm 0,13$ mV (Tab. 7).

Tab. 7: Messpositionsbezogene Feldpotenzialantworten [mV] bei läsierten Tieren hohen Lebensalters auf den ersten ($fEPSP_1$) und den zweiten Stimulus ($fEPSP_2$) nach Doppelpulsstimulation ipsi- und kontralateral der Photothrombose im Vergleich mit den Kontrollwerten (Messpositionen siehe Abb. 4; Mittelwerte \pm SEM).

Position	$fEPSP_1$ Kontrolle	$fEPSP_1$ ipsi	$fEPSP_1$ kontra	$fEPSP_2$ Kontrolle	$fEPSP_2$ ipsi	$fEPSP_2$ kontra
1	2,21 \pm 0,28		2,50 \pm 0,51	1,81 \pm 0,32		1,81 \pm 0,35
2	1,86 \pm 0,36		1,47 \pm 0,26	1,36 \pm 0,27		1,24 \pm 0,27
3	1,67 \pm 0,33		1,31 \pm 0,13	1,23 \pm 0,21		1,09 \pm 0,13
4	1,25 \pm 0,17	1,39 \pm 0,30	1,09 \pm 0,19	1,02 \pm 0,10	0,66 \pm 0,16	0,78 \pm 0,26
5	1,22 \pm 0,19	0,87 \pm 0,10	0,81 \pm 0,07	1,04 \pm 0,13	0,60 \pm 0,13	0,62 \pm 0,11
6	1,44 \pm 0,27	1,41 \pm 0,17	1,04 \pm 0,07	1,01 \pm 0,14	1,03 \pm 0,21	0,66 \pm 0,17
7	1,70 \pm 0,26	1,50 \pm 0,56	1,12 \pm 0,15	1,02 \pm 0,09	1,21 \pm 0,58	0,59 \pm 0,08
8	1,64 \pm 0,19	1,96 \pm 0,11	1,43 \pm 0,40	0,90 \pm 0,08	1,44 \pm 0,22	0,80 \pm 0,38

Bei den läsierten Tieren hohen Lebensalters (n=5) verkleinerten sich die gemittelten Quotienten der Feldpotenzialamplituden ($Q = fEPSP_2 / fEPSP_1$). In der ipsilateralen Hemisphäre sank der Wert von $0,74 \pm 0,01$ auf $0,68 \pm 0,07$ und in der kontralateralen Hemisphäre auf $0,69 \pm 0,04$. Die Verkleinerung der Quotienten zeigte sich besonders deutlich an Position 4 lateral der Läsion mit einer Abnahme von $0,83 \pm 0,05$ auf $0,50 \pm 0,10$ ($p < 0,05$). Die ipsilateralen Messpositionen 6, 7 und 8 zeigten vergrößerte Quotienten, was eine nachlassende funktionale Inhibition indiziert (Tab. 8). Die arealspezifische Auswertung der Amplitudenquotienten zeigte eine Abnahme im ipsilateralen sensomotorischen Kortexareal ($p < 0,05$). Die prozentualen Veränderungen der Amplitudenquotienten im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen sind in Abb. 7 dargestellt.

Tab. 8: Messpositionsbezogene Quotienten ($Q = fEPSP_2 / fEPSP_1$) bei läsierten Tieren hohen Lebensalters ipsi- und kontralateral der Photothrombose im Vergleich mit den Kontrollwerten (Messpositionen siehe Abb. 4; Mittelwerte \pm SEM).

Position	$fEPSP_2 / fEPSP_1$ Kontrolle	$fEPSP_2 / fEPSP_1$ ipsi	$fEPSP_2 / fEPSP_1$ kontra
1	0,81 \pm 0,06		0,74 \pm 0,05
2	0,73 \pm 0,04		0,83 \pm 0,05
3	0,77 \pm 0,07		0,84 \pm 0,07
4	0,83 \pm 0,05	0,50 \pm 0,10	0,69 \pm 0,15
5	0,87 \pm 0,06	0,66 \pm 0,08	0,75 \pm 0,10
6	0,72 \pm 0,06	0,73 \pm 0,11	0,62 \pm 0,12
7	0,62 \pm 0,05	0,75 \pm 0,07	0,53 \pm 0,04
8	0,55 \pm 0,02	0,73 \pm 0,10	0,52 \pm 0,16

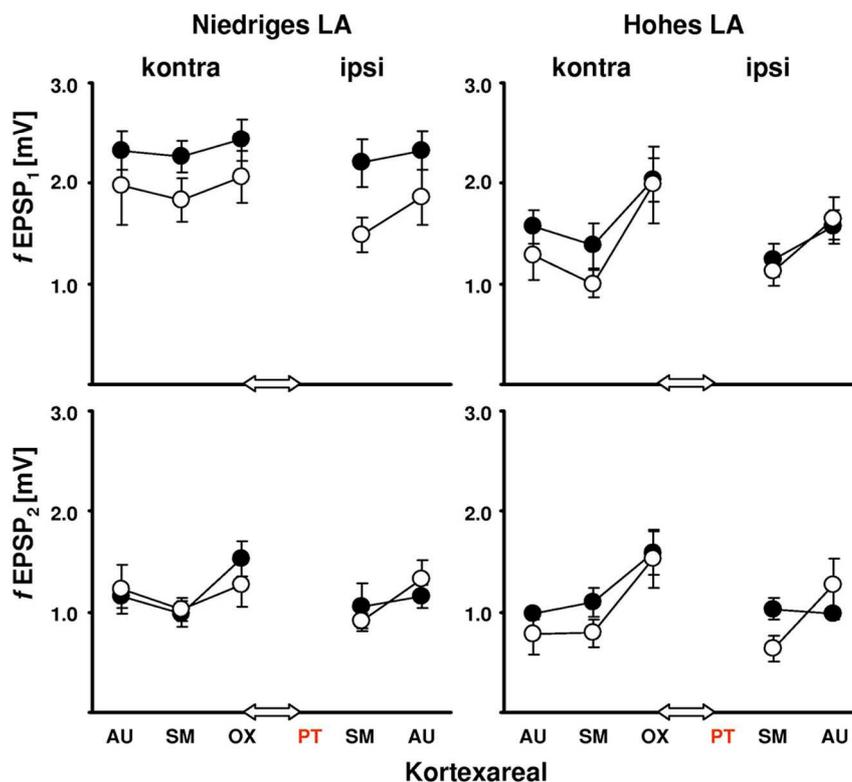


Abb. 6: Zusammenfassende Darstellung der nach Doppelpulsstimulation registrierten Feldpotentiale. Mittlere Feldpotenzialamplituden der untersuchten Kortexareale bei läsierten Tieren (o) und bei Kontrolltieren (•) niedrigen und hohen Lebensalters (LA). Bei den jungen Tieren wurden nach kortikalen Läsionen in beiden Hemisphären kleinere $fEPSP_1$ gemessen, bei den Tieren hohen Lebensalters war diese Reaktion weniger deutlich ausgeprägt und die Amplituden blieben auf Kontrollniveau. Bei den Tieren hohen Lebensalters wurden in unmittelbarer Infarktumgebung kleinere $fEPSP_2$ gemessen. (Arealaufteilung siehe Abb. 4; PT: Photothrombose; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensomotorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; Mittelwerte \pm SEM)

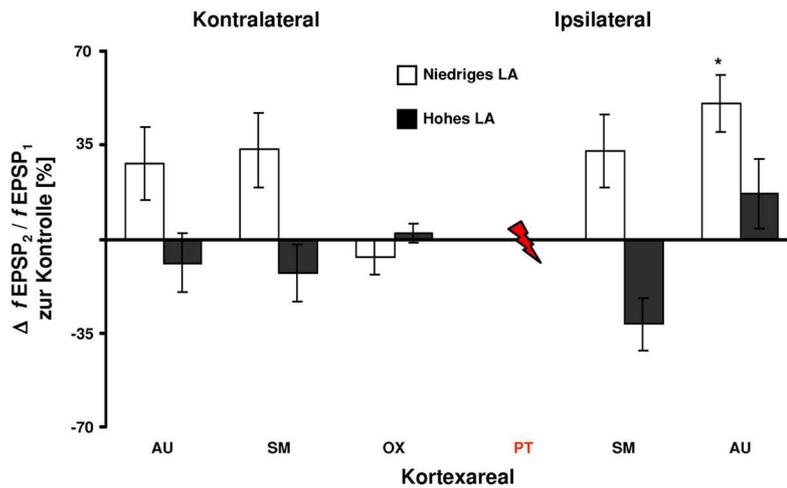


Abb. 7: Darstellung der Veränderungen der Feldpotenzialquotienten. Prozentuale Veränderung der mittleren Quotienten ($Q = fEPSP_2 / fEPSP_1$) bei geschädigten Tieren niedrigen und hohen Lebensalters (LA). Vergrößerte Quotienten (positive Werte) bei den Tieren niedrigen Lebensalters symbolisieren die läsionsbedingte Reduktion der funktionalen Inhibition. Verkleinerte Quotienten (negative Werte) bei den Versuchstieren hohen Lebensalters symbolisieren die läsionsbedingte Zunahme der funktionalen Inhibition. (Arealaufteilung siehe Abb. 4; PT: Photothrombose; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; Mittelwerte \pm SEM;

* $p < 0,05$ Bonferroni-Holm korrigiert)

3.3 Immunhistochemische Untersuchung des GABAergen Systems

Sieben Tage nach der Induktion einer kortikalen Läsion wurden elektrophysiologisch weiträumige und altersabhängige Veränderungen der kortikalen funktionalen Inhibition gezeigt. Da GABA_A-Rezeptoren an der Ausbildung der funktionalen Inhibition beteiligt sind, sollte die Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ am gleichen Ischämiemodell untersucht werden. Zur Analyse dienten Schnitte von 10 Versuchstieren niedrigen Lebensalters sowie Schnitte von 7 Versuchstieren hohen Lebensalters mit einem kortikalen Infarkt. Die Daten der läsionierten Tiere wurden mit den Daten von 5 Kontrolltieren niedrigen und 5 Kontrolltieren hohen Lebensalters verglichen. Die Untersuchungen erfolgten 7 Tage nach der Induktion der Photothrombose. Pro Rezeptoruntereinheit wurde von jedem Tier ein Schnitt aus der Region zwischen -3.6 – -3.8 relativ zu Bregma ausgewertet (Abb. 8). Die immunhistochemische Färbung resultierte im Kortex fast ausnahmslos in einer Färbung des Neuropils (Abb. 9). Bei höheren Vergrößerungen sind subkortikal (nicht dargestellt) und kortikal sehr vereinzelt Zellen zu erkennen. Die Expression der Rezeptoruntereinheiten wurde anhand der relativen optischen Dichte (ROD) analysiert und semiquantitativ ausgewertet. Die entsprechenden Areale sind in Abb. 4 schematisch dargestellt.

Expressionsmuster der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten

Die schichtspezifische kortikale Verteilung der untersuchten GABA_A-Rezeptoruntereinheiten ist in Abb. 10 beispielhaft für das sensomotorische Areal eines Versuchstieres niedrigen Lebensalters dargestellt und ist in den Abbildungen 12 A – 16 A erkennbar. Die folgende Beschreibung trifft für Kontrolltiere niedrigen und hohen Lebensalters zu.

Die $\alpha 1$ -Rezeptoruntereinheit wurde größtenteils neokortikal in der Schicht IV und im oberen Teil der Schicht VI exprimiert. Die äußeren Schichten II/III und die Schicht V zeigten eine vergleichsweise geringe Expression. Die stärkste Immunreaktivität war in Schicht IV des sensomotorischen, gefolgt von Schicht IV des auditorischen Areals zu finden. Das auditorische und das sensomotorische Areal zeigten eine deutliche Lokalisation der Immunreaktivität in Schicht IV und VI. Die Übergänge zwischen den Schichten IV, V und VI im okzipitalen Areal waren fließend.

Die $\alpha 2$ -Rezeptoruntereinheit zeigte die stärkste Expression im Hippokampus, dem piriformen Kortex und der Amygdala. Die stärkste kortikale Expression war in den oberen Kortexschichten I, II/III sowie in Schicht IV auszumachen. Die stärkste Immunreaktivität zeigte dabei das okzipitale und das auditorische Areal. Die Expression nahm in diesen Arealen von den äußeren zu den inneren Kortexschichten graduell ab. Der sensomotorische Kortex zeigte die geringste Färbung. Der Übergang von Schicht IV zu Schicht V war klar abgegrenzt und weniger fließend als im okzipitalen und auditorischen Areal.

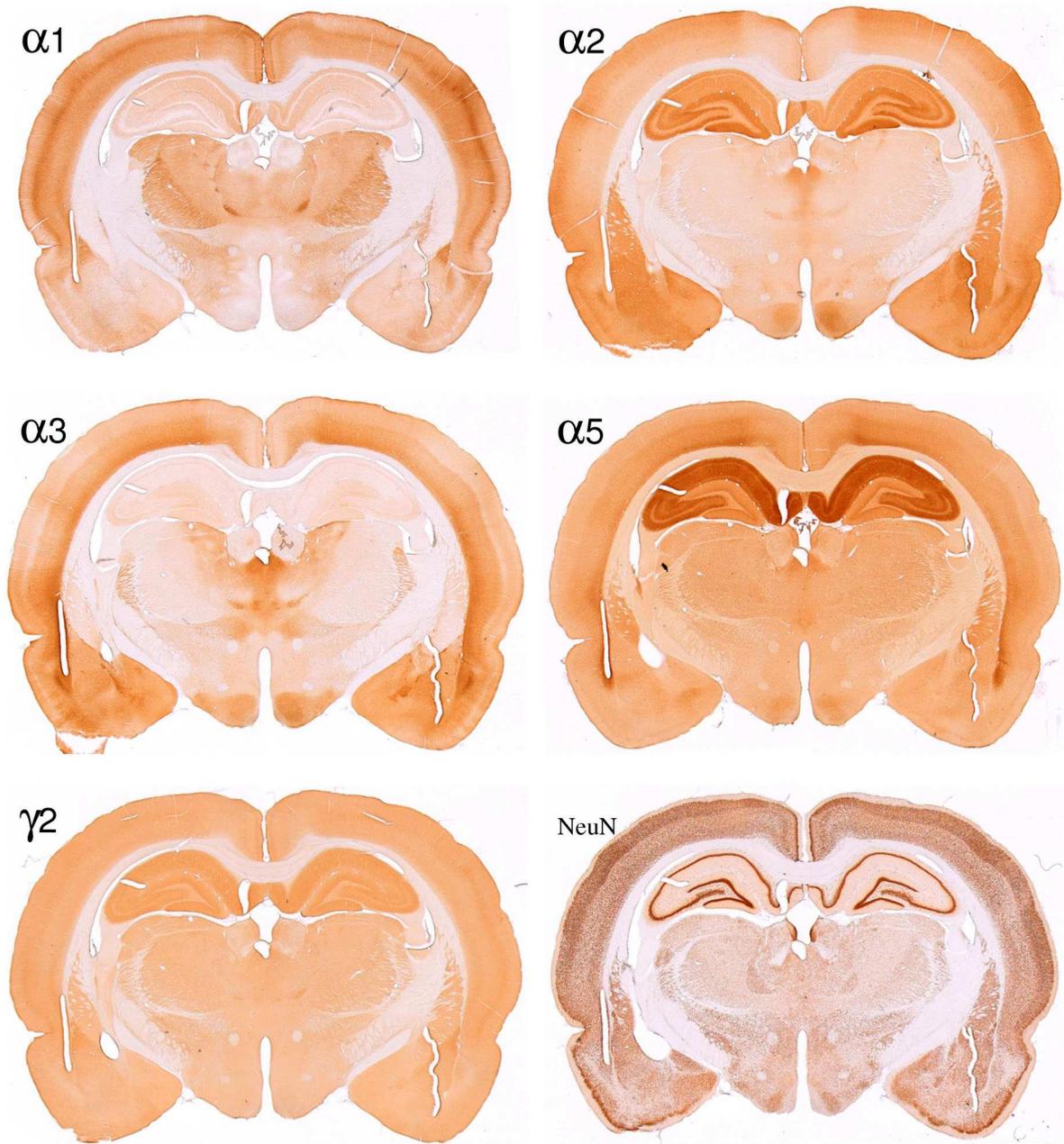


Abb. 8: Serie eines frontal geschnittenen Gehirns eines jungen Versuchstieres. Nach immunohistochemischer Behandlung zeigt sich die spezifische Verteilung der untersuchten GABA_A-Rezeptoruntereinheiten im Vergleich mit einer spezifischen Neuronenfärbung (NeuN). Die Schnittebene entspricht -3,6 – -3,8 relativ zu Bregma (Paxinos and Watson 1986). (1,25 fache Vergrößerung; Balken = 2 mm)

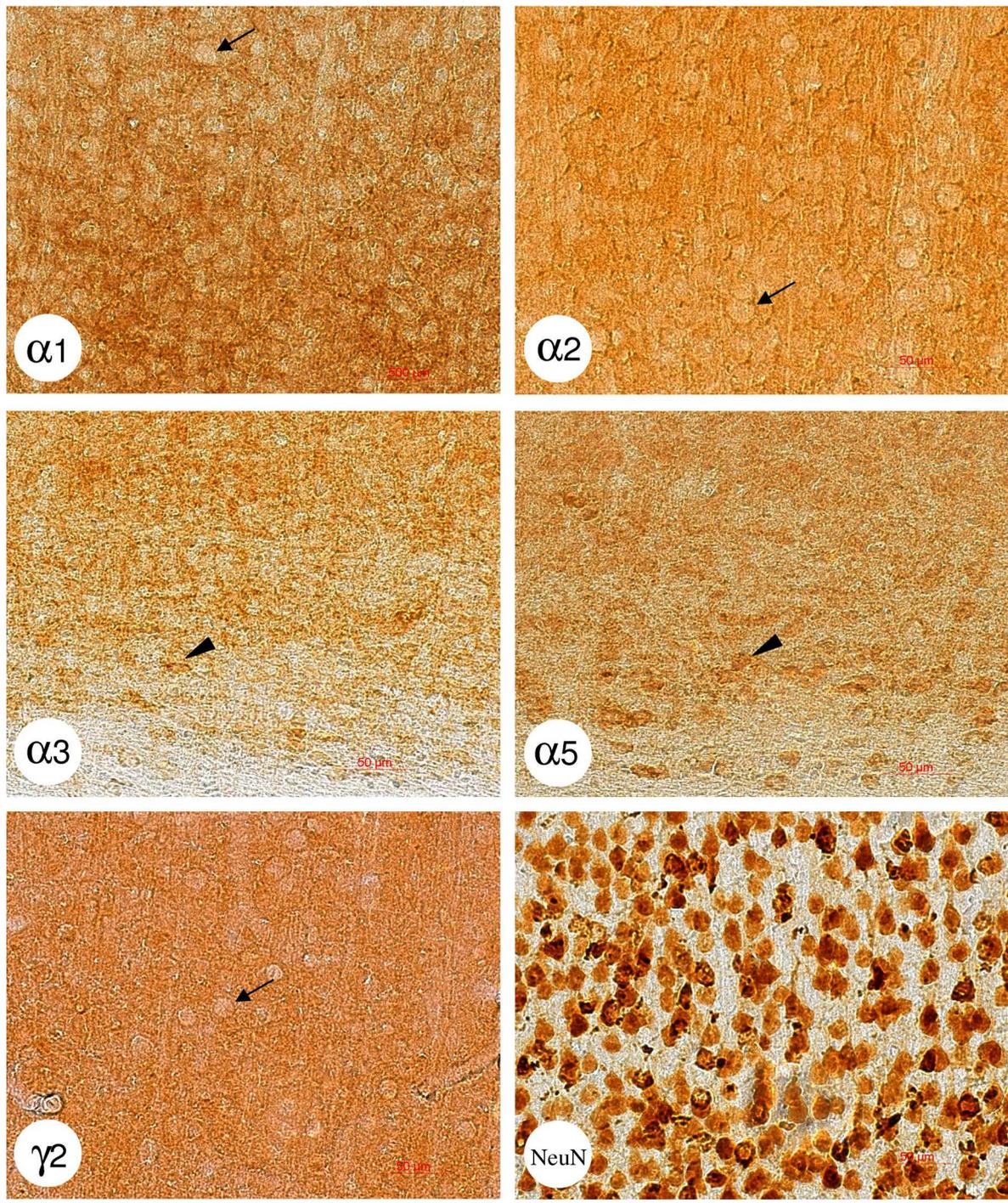


Abb. 9: Hochauflösende Darstellung ausgewählter Bereiche des sensomotorischen Kortexareals. Die Aufnahmen der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$ und NeuN stammen aus der Kortexschicht IV, die der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ aus der Kortexschicht VI. Die Verteilung der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten ist deutlich im Neuropil auszumachen, die Zellkörper sind von der Färbung ausgespart (Pfeile). Lediglich bei den Färbungen der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ ließen sich in Kortexschicht VI vereinzelt Zellkörper erkennen (Pfeilspitzen; 40 fache Vergrößerung; Ausschnitte aus Abb. 7; Balken = 50 μm)

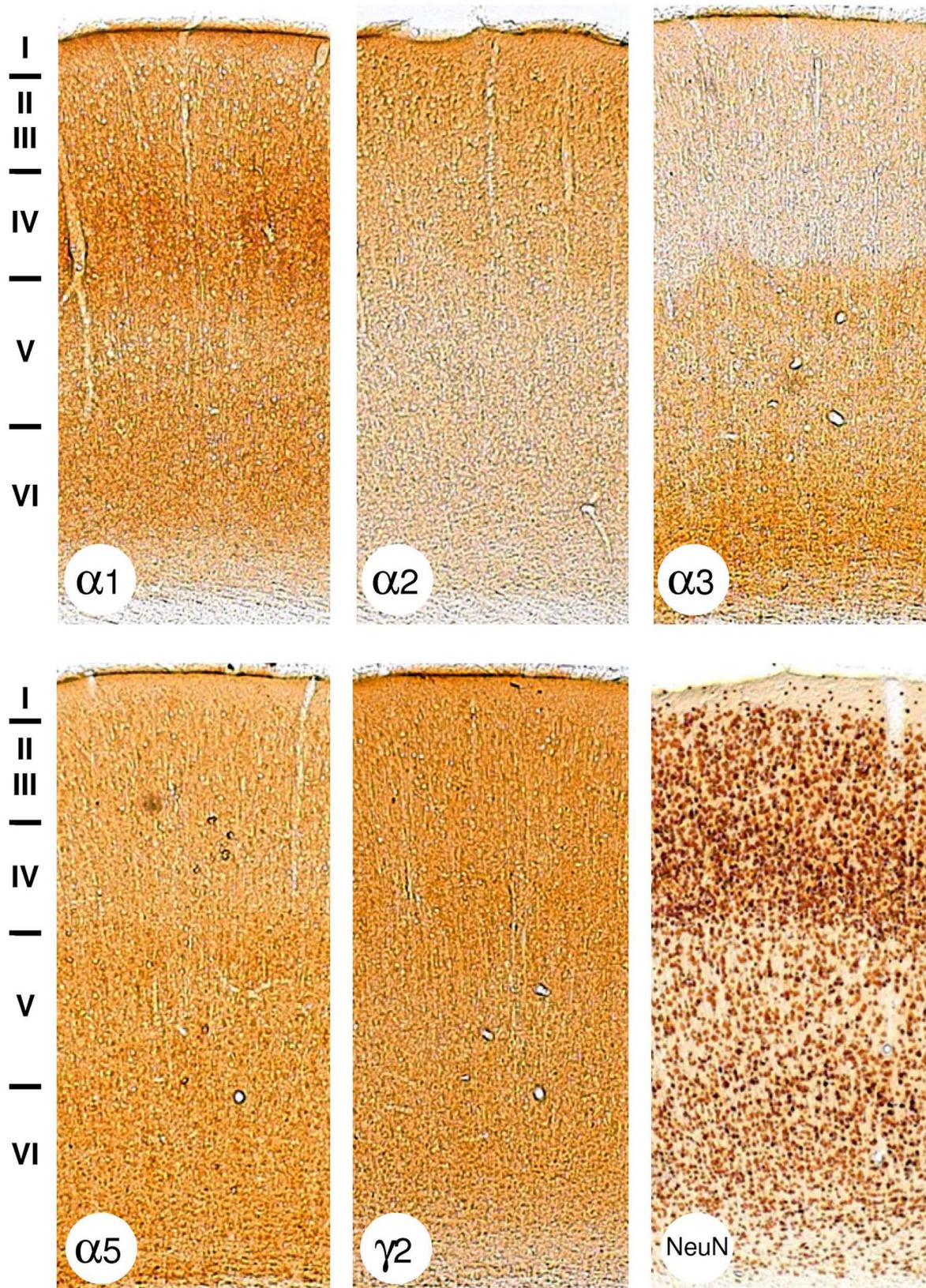


Abb. 10: Schichtspezifische Verteilung der untersuchten GABA_A-Rezeptoruntereinheiten im Kortex. Die Untereinheit $\alpha 2$ zeigte die stärkste Expression in oberen Kortexschichten. Die Untereinheit $\alpha 3$ überwiegt in den unteren Kortexschichten. Die Untereinheit $\alpha 1$ zeigt die stärkste Expression zwischen den Untereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 3$ in mittleren Kortexschichten. Die Expression der Untereinheit $\alpha 5$ überlappte in den unteren Kortexschichten mit der Untereinheit $\alpha 3$. Die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$ waren größtenteils in den gleichen kortikalen Arealen lokalisiert. (4 fache Vergrößerung; Ausschnitte aus Abb. 7)

Die $\alpha 3$ -Rezeptoruntereinheit war hauptsächlich neokortikal und enthorinal exprimiert. Die stärkste Immunreaktivität wurde in den unteren Kortexschichten V und VI gefunden. Die oberen Schichten I, II/III und IV waren durch geringere Immunreaktivität klar abgegrenzt. Die Ausnahme davon bildete Schicht I der okzipitalen Region, die eine deutliche Expression zeigte. Die stärkste Gesamtimmunreaktivität wurde in okzipitalen Arealen gemessen. Die höchsten immunoreaktiven Werte lagen in Schicht VI der auditorischen Regionen. Die geringste Immunreaktivität war in sensomotorischen Arealen zu finden.

Die $\alpha 5$ -Rezeptoruntereinheit war am stärksten im Hippokampus exprimiert wohingegen der Kortex eine vergleichsweise geringe Färbung zeigte. Die stärkste kortikale Expression zeigte das okzipitale Areal. Hier wurde eine klare Konzentrierung der Immunreaktivität im unteren Teil der Schicht VI gefunden. Der obere Teil der Schicht V zeigte eine stärkere Expression. Die Schicht VI und Schicht V der auditorischen Areale zeigten ebenfalls Immunreaktivität. Die sensomotorischen Areale waren insgesamt wenig gefärbt.

Die $\gamma 2$ -Rezeptoruntereinheit war am stärksten im Hippokampus exprimiert. Diese Untereinheit wurde generell weniger schichtspezifisch als die α -Untereinheiten exprimiert. Sie zeigte über allen Kortexschichten eine relativ gleichmäßige Immunreaktivität. Die deutlich stärkste Färbung war in Schicht IV der okzipitalen und auditorischen Areale und in Schicht II/III sowie IV der sensomotorischen Areale auszumachen.

Bei der Betrachtung aller untersuchten GABA_A-Rezeptoruntereinheiten war ein komplementäres Expressionsmuster der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ deutlich zu erkennen. Die Untereinheit $\alpha 2$ zeigte die stärkste Expression in oberen Kortexschichten, in denen die $\alpha 1$ -Untereinheit wenig exprimiert war. Die Untereinheit $\alpha 3$ kam überwiegend in den unteren Kortexschichten vor. Die Untereinheit $\alpha 1$ zeigte die stärkste Expression genau zwischen den Untereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 3$ in den mittleren Kortexschichten. Die

Expression der Untereinheit $\alpha 5$ überlappte in den unteren Kortexschichten mit der Untereinheit $\alpha 3$. Die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$ waren in den gleichen Kortexarealen lokalisiert.

Veränderung der Expressionsstärke im Alter

Die Expressionsstärke der einzelnen GABA_A-Rezeptoruntereinheiten war vom Alter der Versuchstiere abhängig. Das areal- und schichtspezifische Expressionsmuster blieb dabei weitgehend erhalten. Die Immunreaktivität der einzelnen Rezeptoruntereinheiten wurde anhand der relativen optischen Dichte (ROD) in den verschiedenen kortikalen Arealen der Kontrolltiere analysiert. Die Messungen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen der rechten und linken Hemisphäre. Die Daten wurden aus diesem Grund gemittelt. In den Abbildungen 12 B – 16 B und in Tabelle 9 sind die Absolutwerte der ROD-Messungen dargestellt. Die Abbildungen 12 C – 16 C zeigen die altersbedingten Veränderungen der ROD in den kortikalen Schichten der untersuchten Areale. Die prozentualen Veränderungen der GABA_A-Rezeptoruntereinheitenexpression bei Tieren hohen Lebensalters werden im Folgenden im Vergleich mit den jungen Tieren beschrieben. Der Mittelwert der jungen Tiere diente dabei als 100 % Wert.

Die $\alpha 1$ -Rezeptoruntereinheit zeigte im hohen Alter eine tendenziell stärkere Expression, die den gesamten Neokortex betraf und in der Schicht II/III am deutlichsten ausgeprägt war. Die Immunreaktivität stieg bei den Tieren hohen Lebensalters im okzipitalen Areal signifikant an ($9,31 \pm 2,54$ %). Im sensomotorischen und auditorischen Areal stiegen die Werte um $9,97 \pm 4,52$ % bzw. um $11,89 \pm 3,99$ % an.

Die Expression der $\alpha 2$ -Rezeptoruntereinheit zeigte bei den Versuchstieren hohen Lebensalters ein erhöhtes Expressionslevel, das am deutlichsten in den tiefen Kortexschichten V und VI des sensomotorischen Kortex auszumachen war. Die

Immunreaktivität stieg im okzipitalen Areal um $6,27 \pm 3,86$ %, im sensomotorischen Areal um $21,28 \pm 5,89$ % und im auditorischen Areal um $9,44 \pm 4,13$ % an.

Die $\alpha 3$ -Rezeptoruntereinheit zeigte die geringste altersabhängige Variabilität. In den oberen Kortexschichten ist altersbedingt eine vergleichsweise geringere Expression zu beobachten. Die Immunreaktivität sank bei Tieren hohen Lebensalters im okzipitalen Areal um $-1,78 \pm 2,36$ %, stieg im sensomotorischen Areal um $0,54 \pm 7,57$ % und sank im auditorischen Areal um $-8,88 \pm 3,49$ %.

Die stärkste altersabhängige Regulation zeigte die $\alpha 5$ -Rezeptoruntereinheit. Sie wird bei Tieren hohen Lebensalters im gesamten Kortex deutlich geringer exprimiert. Die Immunreaktivität sank bei Tieren hohen Lebensalters im okzipitalen Areal um $-37,72 \pm 7,51$ %, im sensomotorischen Areal signifikant um $-54,84 \pm 10,27$ % und im auditorischen Areal signifikant um $-48,87 \pm 3,68$ %. In der schichtspezifischen Analyse zeigten vor allem die oberen Kortexschichten eine schwächere Expression.

Die $\gamma 2$ -Rezeptoruntereinheit zeigte eine altersbedingt geringere Expression, die hauptsächlich die oberen und unteren Kortexschichten betraf. Die Immunreaktivität sank bei Tieren hohen Lebensalters im okzipitalen Areal um $-12,09 \pm 4,02$ %, im sensomotorischen Areal um $-11,60 \pm 2,54$ % und im auditorischen Areal um $-12,59 \pm 2,57$ %. Die Veränderungen dieser Untereinheit waren in keinem der untersuchten Areale signifikant.

Die altersbedingte Änderung der Gesamtexpression aller untersuchten GABA_A-Rezeptoruntereinheiten ist im sensomotorischen und auditorischen Areal mit 96 % bzw. 88 % am größten und im okzipitalen Areal mit 65 % am kleinsten. In den oberen Kortexschichten I und II/III ist die Veränderung der Gesamtexpression am deutlichsten

ausgeprägt, wobei die einzelnen Untereinheiten unterschiedliche Beiträge zu diesem Muster liefern (Abb. 11). Die Darstellung der arealspezifischen Expressionsänderungen zeigt eine Ähnlichkeit mit dem Muster der altersbedingt verminderten funktionalen Inhibition im sensomotorischen und auditorischen Areal. Die reduzierte funktionale Inhibition geht dabei mit einer nachlassenden Expression der Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ und mit einer verstärkten Expression der Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ einher.

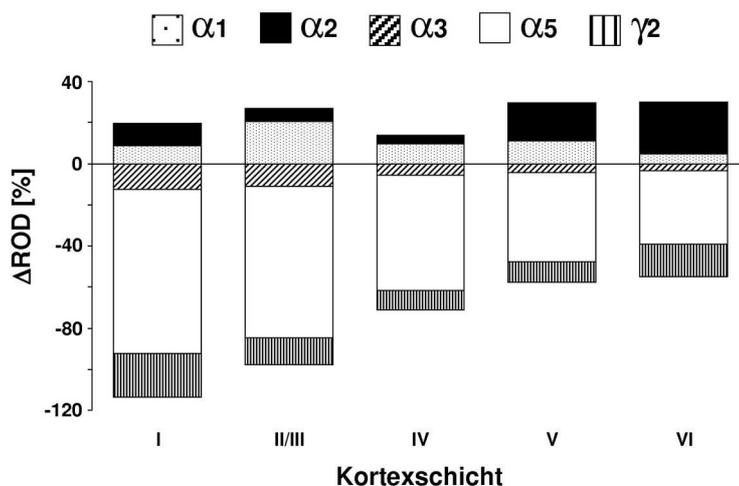


Abb. 11: Zusammenfassende Darstellung der altersbedingten Modulation der GABA_A-Rezeptorexpression. Darstellt sind die schichtbezogenen Änderungen der Expressionsstärke (ROD) der untersuchten GABA_A-Rezeptoruntereinheiten (Mittelwerte aus dem okzipitalen, sensomotorischen und auditorischen Areal). Die nach Addition stärksten Veränderungen vollzogen sich in den oberen Kortexschichten, wobei die unterschiedlichen Untereinheiten individuelle Beiträge leisteten. Zum Beispiel ist die Expression $\alpha 5$ -Untereinheit in stärkerem Maße in den oberen Kortexschichten verändert, die Expression der $\alpha 2$ -Untereinheit ist dagegen hauptsächlich in den unteren Kortexschichten verändert.

Läsionsinduziertes Expressionsmuster

Die Abbildungen 12 D – 16 D zeigen die läsionsbedingten prozentualen Veränderungen der Expressionsstärke der untersuchten GABA_A-Rezeptoruntereinheiten bei Versuchstieren niedrigen und hohen Lebensalters. Die schichtspezifischen prozentualen Expressionsänderungen sind in den Abbildungen 12 E – 16 E dargestellt. Als 100 % Wert diente jeweils der mittlere ROD-Wert der Kontrollgruppe. In Tabelle 9 sind die Absolutwerte der ROD-Messungen dargestellt. Im Folgenden werden die Expressionsänderungen der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten einzeln betrachtet. Die Messwerte der Areale einer Hemisphäre wurden gemittelt.

Die $\alpha 1$ -Untereinheit wurde bei Tieren niedrigen Lebensalters läsionsbedingt bihemisphärisch schwächer exprimiert. Die Expression ist in der läsionierten Hemisphäre

mit $-20,05 \pm 2,92$ % tendenziell schwächer ausgeprägt als in der kontralateralen Hemisphäre mit $-6,52 \pm 2,92$ %. Die Expression war im sensomotorischen und auditorischen Areal der läsierten Hemisphäre mit $-19,54 \pm 4,86$ % bzw. $-20,55 \pm 4,04$ % signifikant ($p < 0,05$) herunterreguliert und betraf alle kortikalen Schichten.

Die läsiensbedingten Änderungen der $\alpha 1$ -Expression waren bei den Tieren hohen Lebensalters weniger deutlich bihemisphärisch ausgeprägt. In der geschädigten Hemisphäre war die verminderte Expression mit $-17,92 \pm 4,60$ % schwächer als bei den jungen Tieren ausgeprägt. In der kontralateralen Hemisphäre schwankte die Expression mit Änderungen von $+1,55 \pm 1,84$ % klar um die Kontrollwerte. Die Minderexpression war im sensomotorischen Areal der geschädigten Hemisphäre mit $-24,47 \pm 6,74$ % signifikant ($p < 0,05$) ausgeprägt und betraf alle kortikalen Schichten.

Die $\alpha 2$ -Untereinheit zeigte bei Tieren niedrigen Lebensalters eine unilaterale verminderte Expression von $-27,72 \pm 3,87$ % in der läsierten Hemisphäre. In der kontralateralen Hemisphäre schwankten die Werte mit $-1,17 \pm 2,93$ % um das Kontrolllevel. Im geschädigten sensomotorischen Areal war die Minderexpression mit $-35,21 \pm 6,15$ % signifikant ($p < 0,05$) ausgeprägt und zeigte sich in den Kortexschichten II/III und IV.

Bei den Tieren hohen Lebensalters war die läsiensbedingte Reaktion in stärkerem Maße als bei den Tieren niedrigen Lebensalters und zusätzlich bihemisphärisch ausgeprägt. In der geschädigten Hemisphäre sank die Expression der $\alpha 2$ -Untereinheit um $-54,99 \pm 5,39$ % und kontralateral um $-18,33 \pm 3,67$ %. Die verminderte Expression dieser Untereinheit war im sensomotorischen und auditorischen Areal der läsierten Hemisphäre mit $-63,89 \pm 7,14$ % bzw. $-28,85 \pm 7,33$ % signifikant ($p < 0,05$) ausgeprägt.

Kontralateral sank die Expression im okzipitalen Areal signifikant um $-19,51 \pm 5,43 \%$ ($p < 0,05$). Die Minderexpression war in tiefen Kortexschichten am stärksten ausgeprägt.

Bei Tieren niedrigen Lebensalters wurde die $\alpha 3$ -Untereinheit in der läsierten Hemisphäre um $-20,62 \pm 4,24 \%$ schwächer exprimiert. Kontralateral war die Expression mit Änderungen um $-1,13 \pm 3,07 \%$ auf Kontrollniveau. Im sensomotorischen Areal der läsierten Hemisphäre war die Minderexpression mit $-29,46 \pm 8,31 \%$ signifikant ($p < 0,05$) ausgeprägt und betraf die äußeren kortikalen Schichten am stärksten.

Im Gegensatz zu den Tieren niedrigen Lebensalters war die läsiensbedingte Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit bei den Tieren hohen Lebensalters bihemisphärisch und gegensätzlich reguliert. In der läsierten Hemisphäre verminderte sich die Expression um $-21,30 \pm 4,38 \%$, in der kontralateralen Hemisphäre stieg die Expression um $+11,21 \pm 3,95 \%$.

Die Expression der $\alpha 5$ -Untereinheit war nach induzierter Photothrombose bei Tieren niedrigen Lebensalters bihemisphärisch vermindert. Die Expressionsstärke sank in der läsierten Hemisphäre um $-20,39 \pm 6,19 \%$ und kontralateral um $-17,95 \pm 5,09 \%$.

Bei den Tieren hohen Lebensalters zeigte sich läsiensbedingt eine bihemisphärisch stärker ausgeprägte Expression der $\alpha 5$ -Untereinheit. In der geschädigten Hemisphäre stiegen die Werte um $+64,36 \pm 13,49 \%$, kontralateral um $+25,79 \pm 10,33 \%$. Die verstärkte Expression war deutlich in den oberen Kortexschichten ausgeprägt.

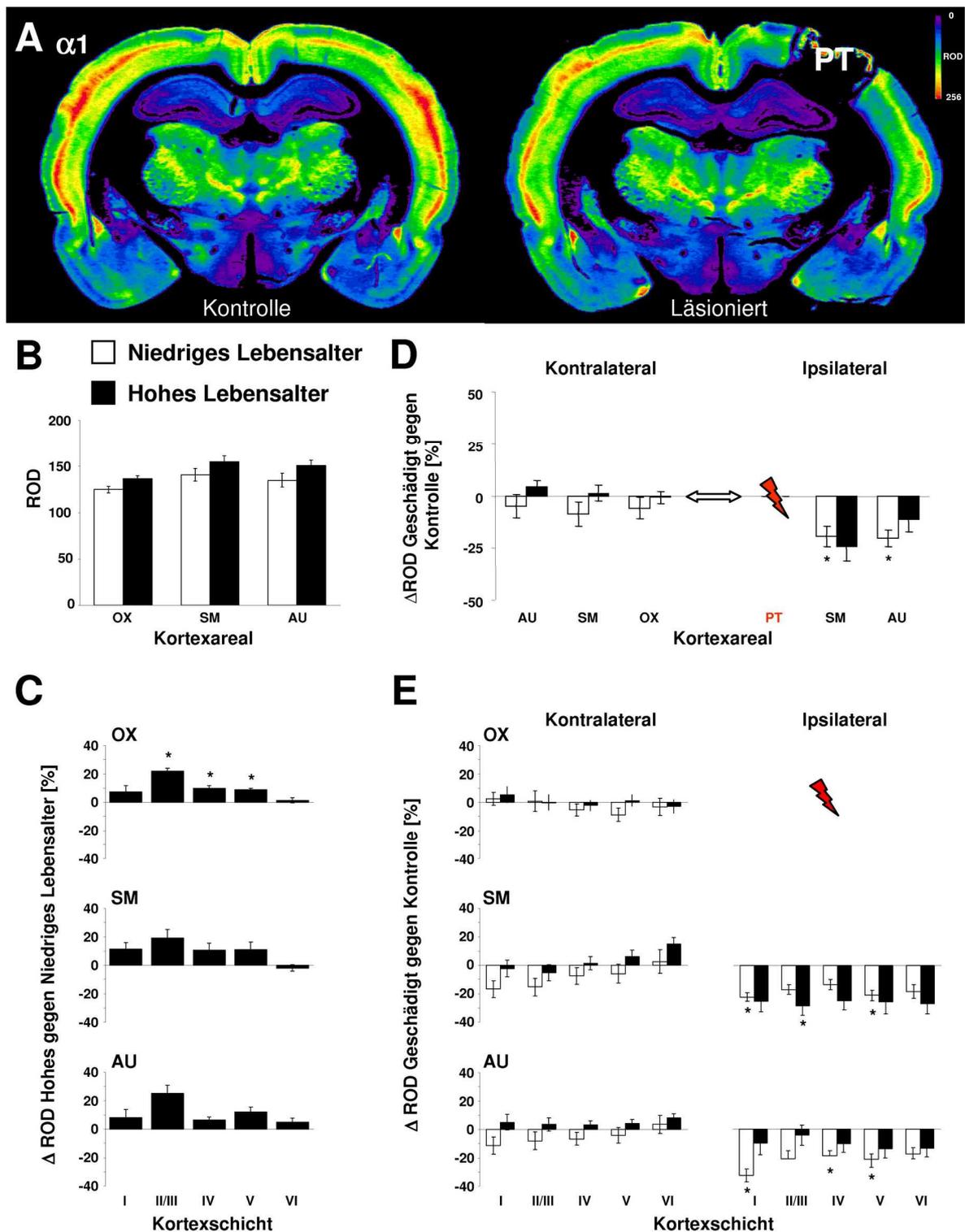


Abb. 12: Semiquantitative Auswertung der Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$. **A:** Immunhistochemisch behandelte und falschfarbenkodierte frontale Gehirnschnitte. **B:** Areal-spezifische Expressionsstärke bei Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters. **C:** Prozentuale Veränderung der schichtspezifischen Expressionsstärke bei Tieren hohen Lebensalters im Vergleich zu den Jungtieren. **D:** Prozentuale Veränderungen der areal-spezifischen Expressionsstärke bei läsierten Tieren niedrigen und hohen Lebensalters im Vergleich zur Kontrolle. (Arealaufteilung siehe Abb. 4; PT: Photothrombose; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensomotorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, Bonferroni-Holm korrigiert)

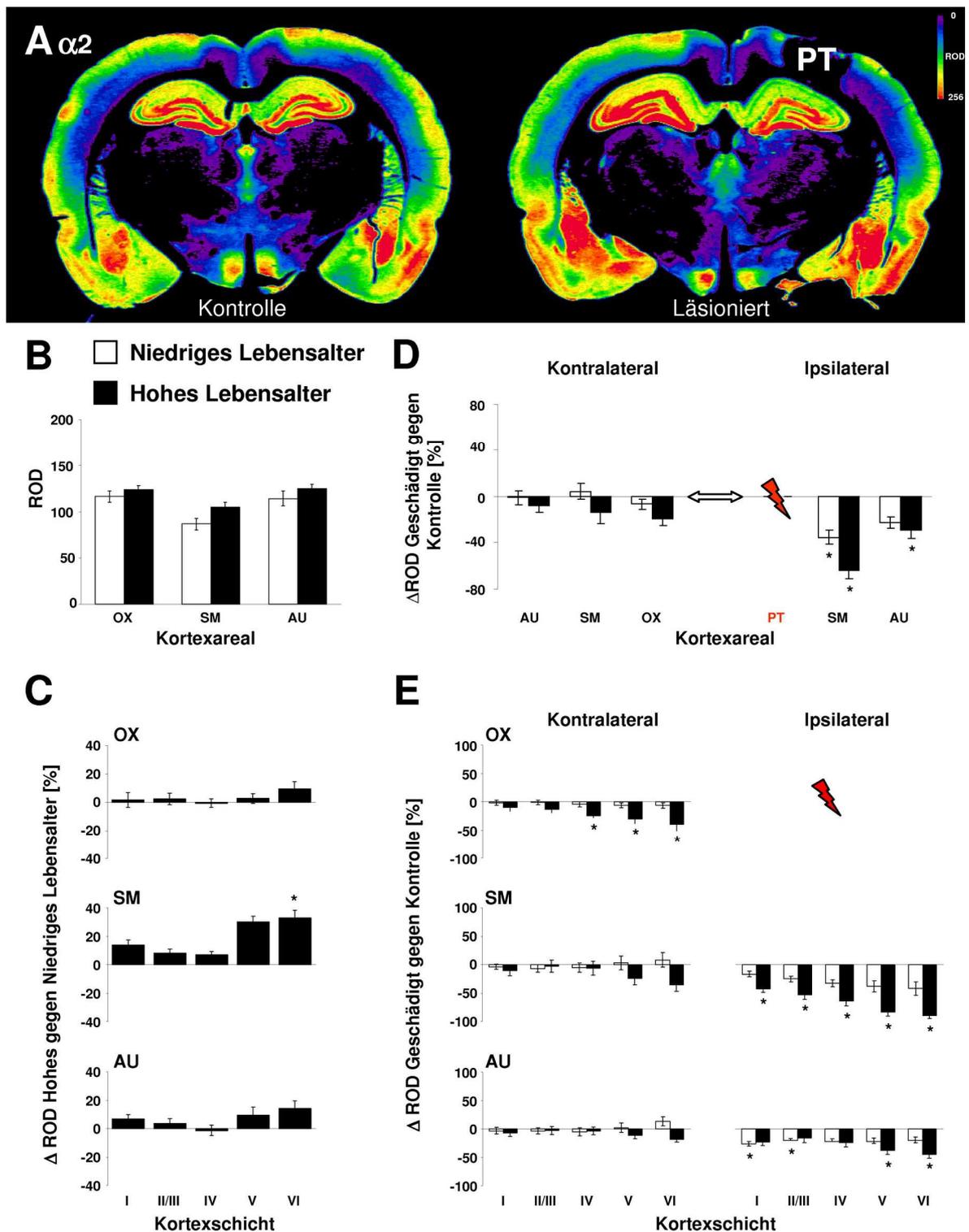


Abb. 13: Semiquantitative Auswertung der Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheit α_2 . **A:** Immunhistochemisch behandelte und falschfarbenkodierte frontale Gehirnschnitte. **B:** Areal-spezifische Expressionsstärke bei Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters. **C:** Prozentuale Veränderung der schichtspezifischen Expressionsstärke bei Tieren hohen Lebensalters im Vergleich zu den Jungtieren. **D:** Prozentuale Veränderungen der areal-spezifischen Expressionsstärke bei läsierten Tieren niedrigen und hohen Lebensalters im Vergleich zur Kontrolle. **E:** Prozentuale Veränderungen der schichtspezifischen Expressionsstärke bei läsierten Tieren niedrigen und hohen Lebensalters im Vergleich zur Kontrolle. (Arealaufteilung siehe Abb. 4; PT: Photothrombose; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensomotorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, Bonferroni-Holm korrigiert)

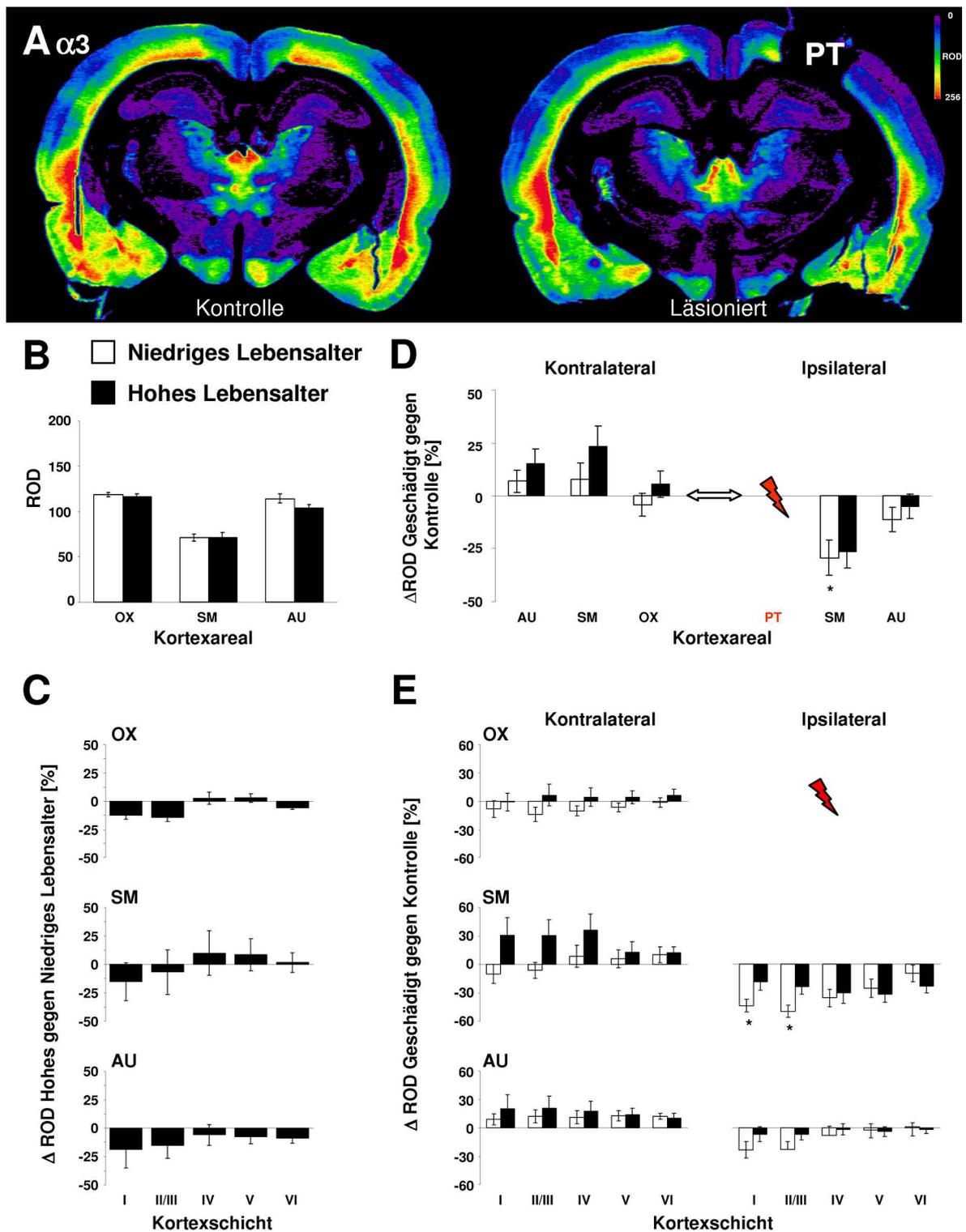


Abb. 14: Semiquantitative Auswertung der Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$. **A:** Immunhistochemisch behandelte und falschfarbenkodierte frontale Gehirnschnitte. **B:** Areal-spezifische Expressionsstärke bei Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters. **C:** Prozentuale Veränderung der schichtspezifischen Expressionsstärke bei Tieren hohen Lebensalters im Vergleich zu den Jungtieren. **D:** Prozentuale Veränderungen der areal-spezifischen Expressionsstärke bei läsierten Tieren niedrigen und hohen Lebensalters im Vergleich zur Kontrolle. **E:** Prozentuale Veränderungen der schichtspezifischen Expressionsstärke bei läsierten Tieren niedrigen und hohen Lebensalters im Vergleich zur Kontrolle. (Arealaufteilung siehe Abb. 4; PT: Photothrombose; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensomotorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, Bonferroni-Holm korrigiert)

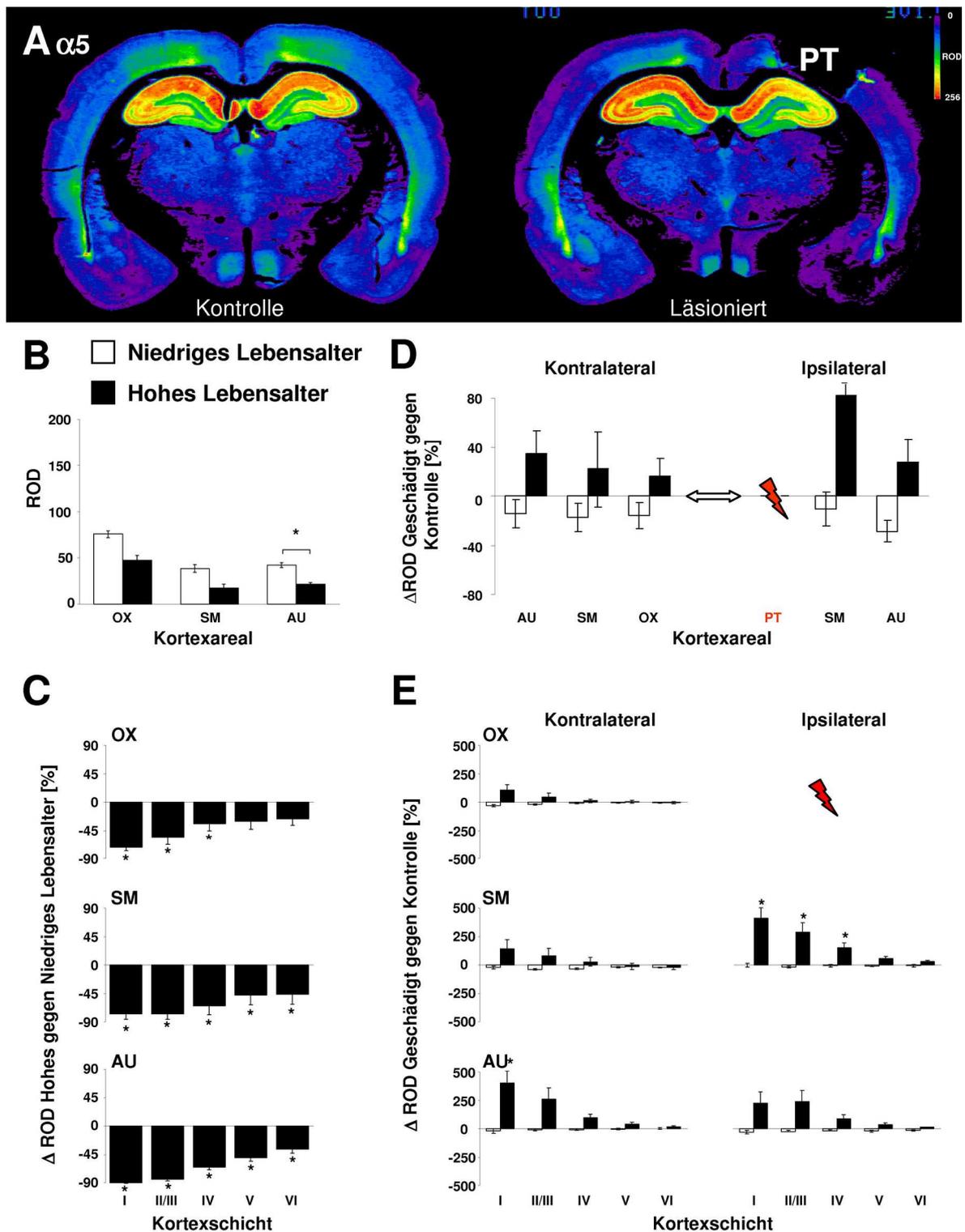


Abb. 15: Semiquantitative Auswertung der Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$. **A:** Immunhistochemisch behandelte und falschfarbenkodierte frontale Gehirnschnitte. **B:** Areal-spezifische Expressionsstärke bei Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters. **C:** Prozentuale Veränderung der schichtspezifischen Expressionsstärke bei Tieren hohen Lebensalters im Vergleich zu den Jungtieren. **D:** Prozentuale Veränderungen der areal-spezifischen Expressionsstärke bei läsierten Tieren niedrigen und hohen Lebensalters im Vergleich zur Kontrolle. (Arealaufteilung siehe Abb. 4; PT: Photothrombose; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensomotorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, Bonferroni-Holm korrigiert)

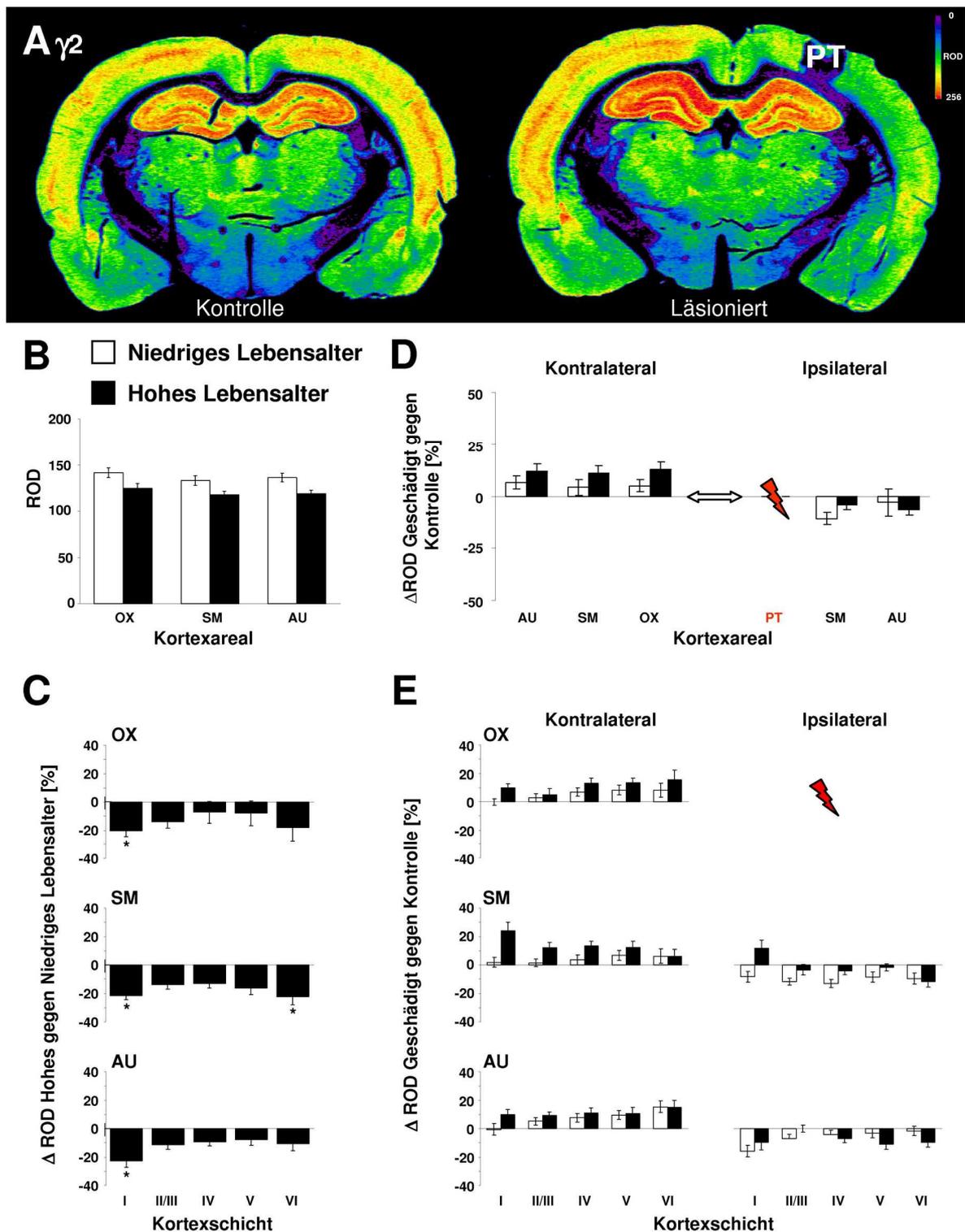


Abb. 16: Semiquantitative Auswertung der Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheit γ_2 . **A:** Immunhistochemisch behandelte und falschfarbenkodierte frontale Gehirnschnitte. **B:** Areal spezifische Expressionsstärke bei Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters. **C:** Prozentuale Veränderung der schichtspezifischen Expressionsstärke bei Tieren hohen Lebensalters im Vergleich zu den Jungtieren. **D:** Prozentuale Veränderungen der arealspezifischen Expressionsstärke bei läsierten Tieren niedrigen und hohen Lebensalters im Vergleich zur Kontrolle. (Arealaufteilung siehe Abb. 4; PT: Photothrombose; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensomotorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, Bonferroni-Holm korrigiert)

Die $\gamma 2$ -Rezeptoruntereinheit zeigte eine geringe läsionsbedingte Regulation der Expression. Bei Tieren niedrigen Lebensalters war die Regulation bihemisphärisch gegensätzlich. In der läsionierten Hemisphäre wurde die Untereinheit im Schnitt um $-7,31 \pm 2,60$ % weniger exprimiert, kontralateral stieg die Expression um $+5,34 \pm 1,64$ % an.

Die Tiere hohen Lebensalters zeigten in der läsionierten Hemisphäre eine um $-2,34 \pm 1,88$ % verminderte Expression der $\gamma 2$ -Rezeptoruntereinheit. In der kontralateralen Hemisphäre war die Expression um $+11,43 \pm 1,54$ % stärker ausgeprägt.

Tab. 9: ROD-Werte der untersuchten GABA_A-Rezeptoruntereinheiten nach kortikaler Schädigung. (LA: Lebensalter; PT: Photothrombose; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensomotorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; Mittelwerte \pm SEM; * p < 0,05 läsioniert vs. Kontrolle, ‡ p < 0,05 niedriges vs. hohes Lebensalter)

Untereinheit	Alter Areal	Niedriges LA			Hohes LA		
		Kontrolle	PT – ipsi	PT – kontra	Kontrolle	PT – ipsi	PT – kontra
$\alpha 1$	OX	124,8 \pm 3,7	PT	117,5 \pm 6,0	136,5 \pm 3,2	PT	135,3 \pm 4,0
	SM	140,8 \pm 6,5	113,3 \pm 6,5*	128,5 \pm 7,7	154,8 \pm 6,6	116,9 \pm 10	156,6 \pm 6,0
	AU	134,9 \pm 7,1	107,2 \pm 5,2*	128,2 \pm 7,3	151,0 \pm 5,4	133,8 \pm 8,8	157,5 \pm 4,4
$\alpha 2$	OX	116,4 \pm 6,3	PT	108,3 \pm 4,6	123,7 \pm 4,5	PT	99,5 \pm 6,7
	SM	86,4 \pm 6,2	56,0 \pm 5,0*	90,1 \pm 5,8	104,8 \pm 5,1	37,8 \pm 7,5*	90,0 \pm 9,9
	AU	114,2 \pm 8,2	88,4 \pm 5,5	112,9 \pm 6,7	125,0 \pm 4,7	88,9 \pm 9,2*	114,5 \pm 6,7
$\alpha 3$	OX	118,1 \pm 2,6	PT	113,1 \pm 6,1	116,0 \pm 2,8	PT	122,0 \pm 7,0
	SM	70,8 \pm 4,0	50,0 \pm 5,6*	76,1 \pm 5,2	71,2 \pm 5,4	52,4 \pm 5,3	87,6 \pm 7,1
	AU	113,8 \pm 4,8	100,9 \pm 6,4	121,4 \pm 5,6	103,7 \pm 4,0	98,3 \pm 5,9	119,3 \pm 7,0
$\alpha 5$	OX	75,4 \pm 3,3	PT	63,3 \pm 7,7	47,0 \pm 5,7	PT	54,7 \pm 6,7
	SM	38,3 \pm 4,1	34,2 \pm 5,1	31,6 \pm 4,1	17,3 \pm 3,9	31,6 \pm 4,9	21,1 \pm 5,3
	AU	42,2 \pm 2,6	30,1 \pm 3,6	36,2 \pm 4,6	21,6 \pm 1,6‡	27,5 \pm 4,2	29,1 \pm 4,0
$\gamma 2$	OX	141,3 \pm 5,2	PT	148,2 \pm 3,8	124,2 \pm 5,7	PT	140,2 \pm 4,1
	SM	133,1 \pm 5,0	118,7 \pm 3,8	138,5 \pm 4,7	117,6 \pm 3,4	112,6 \pm 2,7	130,7 \pm 4,0
	AU	136,1 \pm 4,3	131,9 \pm 8,4	145,1 \pm 3,9	119,0 \pm 3,5	111,4 \pm 3,1	133,4 \pm 4,0

Die Expression der verschiedenen GABA_A-Rezeptoruntereinheiten wurde nach kortikalen Läsionen bei Tieren niedrigen und hohen Lebensalters in verschiedenem Maße verändert (Abb. 17). Bei den jungen Tieren vollzogen sich die stärksten Expressionsänderungen bei der Untereinheit $\alpha 2$ in den unteren Kortexschichten und bei der Untereinheit $\alpha 3$ in den oberen Kortexschichten. Die Expression war bilateral aber hauptsächlich in der läsierten Hemisphäre moduliert. Die Summe der Änderungen der Expression war in den oberen Kortexschichten am größten. Bei den Tieren hohen Lebensalters war die Expression der Untereinheit $\alpha 5$ in den oberen Kortexschichten und die Expression der Untereinheit $\alpha 2$ in den unteren Kortexschichten am stärksten moduliert. Die Summe der Änderungen der Expression war bei den alten Tieren in den oberen Kortexschichten am größten und übertraf die Gesamtänderungen der Jungtiere.

Die reduzierte funktionale Inhibition nach der kortikalen Läsion ging bei den Tieren niedrigen Lebensalters überwiegend mit einer verminderten Expression der Rezeptoruntereinheiten einher. Die verstärkte funktionale Inhibition nach der kortikalen Läsion bei den Tieren hohen Lebensalters war mit einer teilweise verstärkten Expression, vor allem der Untereinheit $\alpha 5$, vergesellschaftet (Abb. 17).

Bei der Betrachtung der schichtspezifischen alters- und läsiungsbedingten Veränderungen der Rezeptorexpression fiel auf, dass bei den Untereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 5$ die läsiungsinduzierten Expressionsänderungen bei den Tieren hohen Lebensalters den altersbedingten Expressionsänderungen entgegengesetzt sind (Abb. 12 – 16).

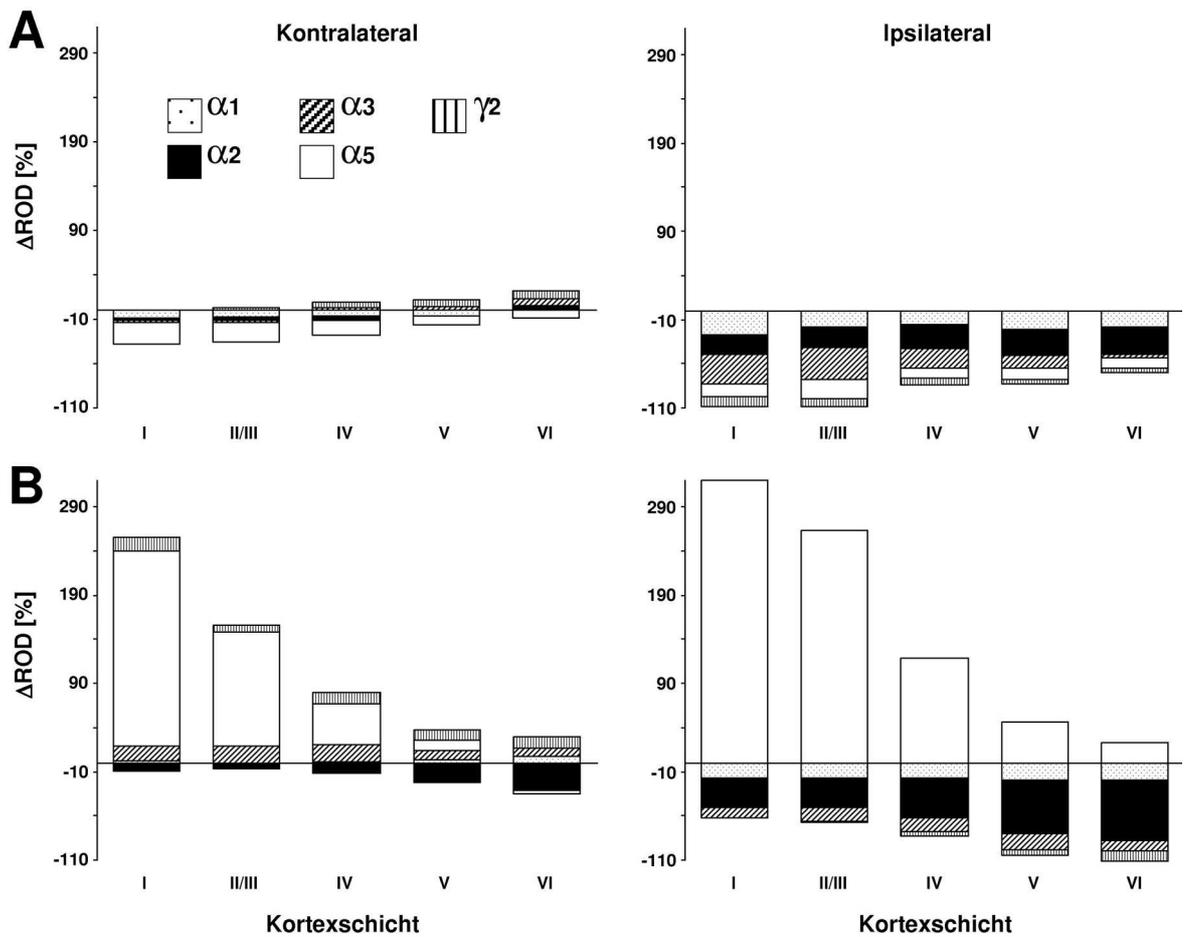


Abb. 17: Läsionsbedingte schichtspezifische Expressionsänderungen der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten. A: Bei den Tieren niedrigen Lebensalters zeigt sich die Rezeptorexpression nach einer kortikalen Läsion bilateral – aber hauptsächlich ipsilateral – moduliert. Den Hauptanteil der Gesamtexpressionsänderungen der hier untersuchten Untereinheiten trägt $\alpha 2$ in den unteren Kortexschichten und $\alpha 3$ in den oberen Kortexschichten. **B:** Bei Tieren hohen Lebensalters ist die Reaktion ebenfalls bilateral, aber bedeutend stärker als bei den Jungtieren ausgeprägt. Den Hauptanteil der Änderung der Gesamtexpression trägt die $\alpha 5$ -Untereinheit in den oberen Kortexschichten und die $\alpha 2$ -Untereinheit in den unteren Kortexschichten. (Mittelwerte aus dem okzipitalen, sensomotorischen und auditorischen Areal)

3.4 Untersuchung der GFAP- und NeuN-Immunreaktivität

GFAP

Die Messungen der ROD ergaben bei Tieren beider Kontrollgruppen eine Arealabhängigkeit der GFAP-Immunreaktivität (Abb. 18). Das okzipitale Areal ließ dabei, gefolgt vom auditorischen Areal, die stärkste Reaktivität erkennen. Im sensomotorischen Areal fand sich die geringste Immunreaktivität. Bei den Tieren hohen Lebensalters nahm die Immunreaktivität im sensomotorischen und auditorischen Areal tendenziell ab. Nach einer Photothrombose entwickelte sich im Randgebiet der Läsion eine ausgeprägte Gliose. Diese bildete eine Kapsel um das nekrotische Gewebe. Die GFAP-Immunreaktivität nahm bei Versuchstieren niedrigen und hohen Lebensalters im gesamten ipsilateralen Kortex signifikant zu. Im sensomotorischen Areal stiegen die Werte bei Tieren niedrigen Lebensalters um 160 % und bei Tieren hohen Lebensalters um 191 % an. Im auditorischen Kortex war bei Tieren niedrigen Lebensalters ein Anstieg um 96 % und bei Tieren hohen Lebensalters um 77 % zu verzeichnen. Die Regulationen waren bei den Tieren hohen Lebensalters im Vergleich mit Jungtieren nicht signifikant verschieden. Kontralateral zeigten sich keine messbaren Veränderungen.

NeuN

Die Messungen der ROD ergaben bei Tieren beider Kontrollgruppen eine Arealabhängigkeit der NeuN-Immunreaktivität (Abb. 19). Bei den Tieren hohen Lebensalters nahm die Immunreaktivität im sensomotorischen und auditorischen Areal tendenziell ab. Nach einer Photothrombose nahm die Immunreaktivität von NeuN bei Versuchstieren niedrigen und hohen Lebensalters im ipsi- und kontralateralen Kortex tendenziell zu. Die läsionsbedingten Veränderungen waren bei Tieren hohen Lebensalters stärker ausgeprägt.

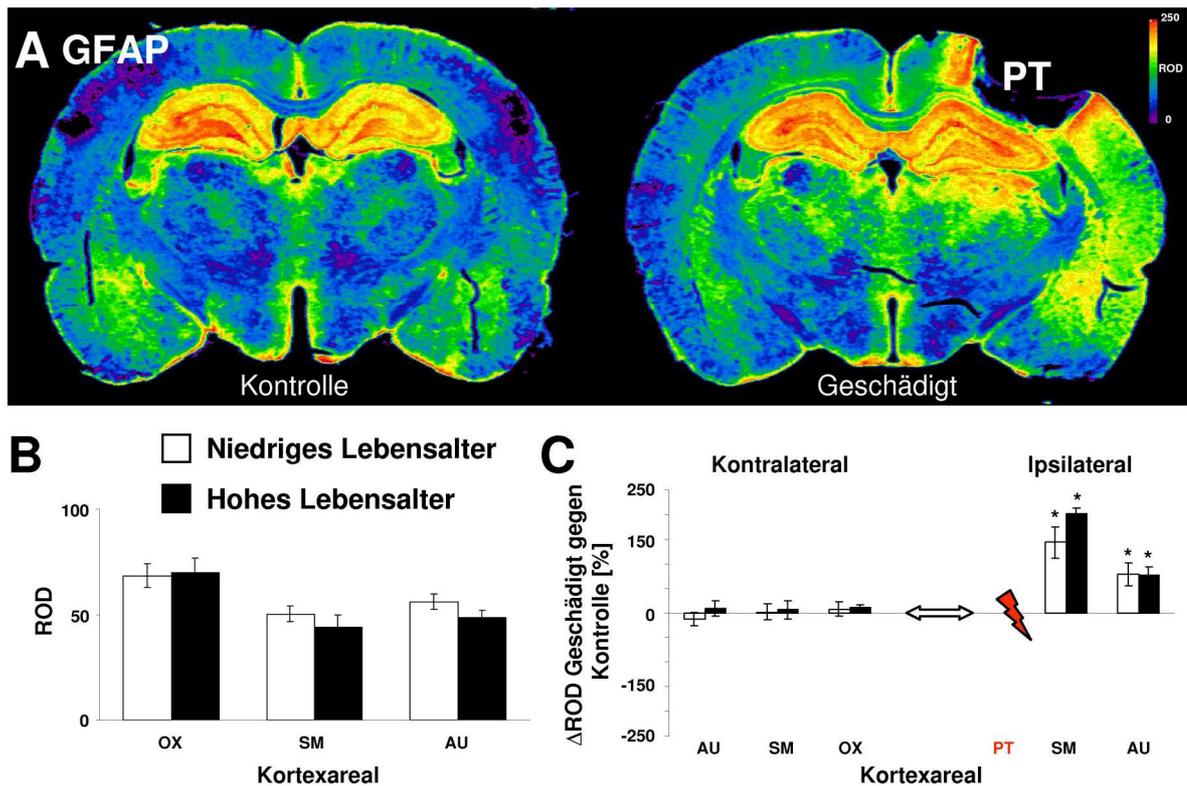


Abb. 18: Semiquantitative Auswertung der GFAP-Immunreaktivität. **A:** Immunhistochemisch behandelte und falschfarbenkodierte frontale Gehirnschnitte. **B:** Areal-spezifische Expressionsstärke bei Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters. **C:** Prozentuale Veränderungen der areal-spezifischen Expressionsstärke bei läsierten Tieren niedrigen und hohen Lebensalters im Vergleich mit der Kontrolle. (Arealaufteilung siehe Abb. 4; PT: Photothrombose; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensomotorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, Bonferroni-Holm korrigiert)

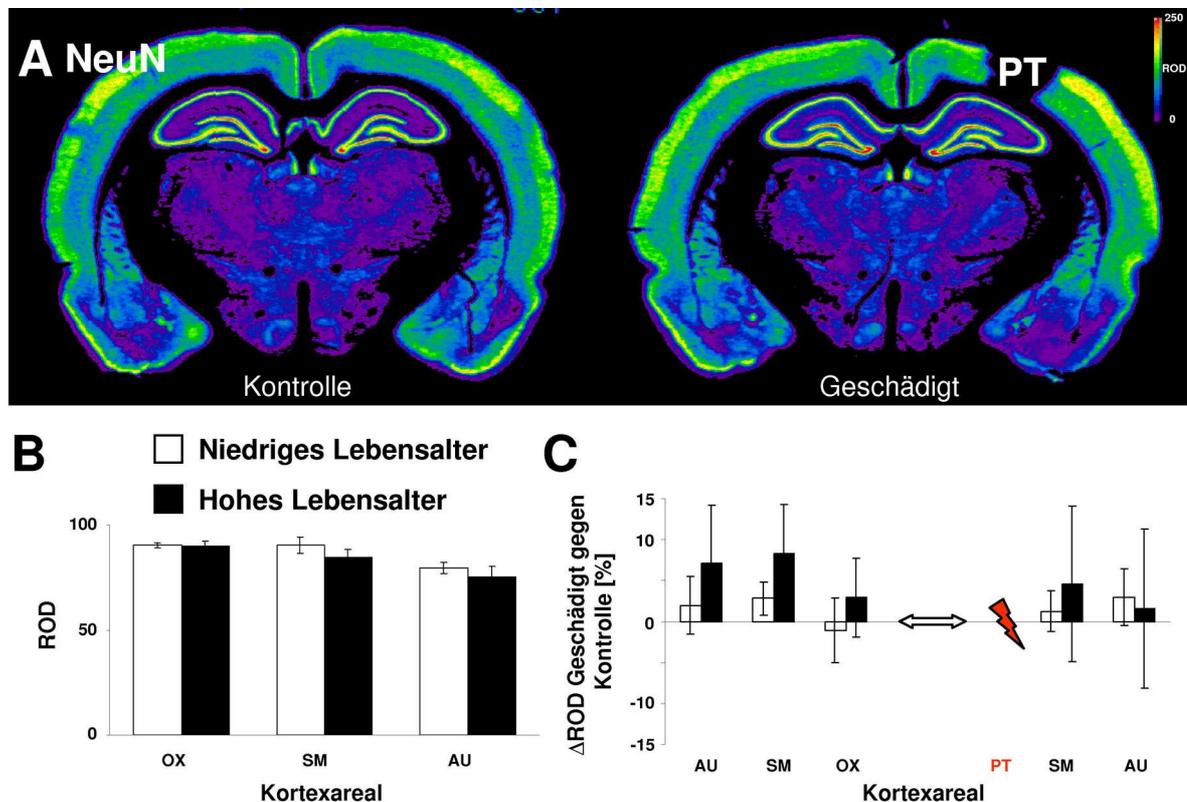


Abb. 19: Semiquantitative Auswertung der NeuN-Immunreaktivität. **A:** Immunhistochemisch behandelte und falschfarbenkodierte frontale Gehirnschnitte. **B:** Areal-spezifische Expressionsstärke bei Kontrolltieren niedrigen und hohen Lebensalters. **C:** Prozentuale Veränderungen der areal-spezifischen Expressionsstärke bei läsierten Tieren niedrigen und hohen Lebensalters im Vergleich mit der Kontrolle. (Arealaufteilung siehe Abb. 4; PT: Photothrombose; OX: okzipitaler Kortex; SM: sensomotorischer Kortex; AU: auditorischer Kortex; Mittelwerte \pm SEM)

4. DISKUSSION

4.1 Diskussion der Untersuchungsmethoden

Photothrombotische Induktion kortikaler Läsionen

Das Photothrombosemodell nach Watson (Watson et al. 1985) ist bei Ratten niedrigen und hohen Lebensalters gleichermaßen anwendbar. In diesem Versuchsansatz wurde auf identische Läsionsgrößen in beiden Versuchsgruppen geachtet. Die Menge an intravenös injiziertem Fluorescein-Farbstoff Bengal Rosa war dem größeren Körpergewicht der Versuchstiere hohen Lebensalters angepasst. Dennoch bildeten die Ratten hohen Lebensalters bei identischen Belichtungsbedingungen kleinere Läsionen als die Jungtiere aus. Die Ursache für die geringere Effektivität der Methode bei den Tieren hohen Lebensalters könnte eine verminderte Lichtdurchlässigkeit des Gewebes sein. Für die Induktion der Photothrombose ist die auf den Farbstoff einfallende Lichtmenge einer bestimmten Wellenlänge von entscheidender Bedeutung. Durch die photochemische Reaktion kommt es zur Bildung von Sauerstoffradikalen und einer Schädigung des Gefäßendothels im belichteten Bereich (Gandin et al. 1983). Die durch den mikrovaskulären Endothelschaden aktivierte Aggregation der Thrombozyten hat eine irreversible Okklusion pialer- und parenchymaler Gefäße und die anschließende Infarzierung zur Folge (Watson et al. 1985; Dietrich et al. 1987a; Dietrich et al. 1987b). Mit fortschreitendem Lebensalter vollzieht sich neben der Verdickung der Schädeldecke eine Modulation zerebrovaskulärer Eigenschaften. Die fortgeschrittene Arteriosklerose, die Verdickung der arteriellen Basalmembranen, die vermehrte Einlagerung von Kollagenfibrillen in den Arterienwänden sowie der altersbedingt veränderte Aufbau des Bindegewebes und der glatten Muskulatur der zerebralen Gefäße (Donahue et al. 1967; Dahl 1976) könnte die Belichtung des Farbstoffes bei den Ratten hohen Lebensalters negativ beeinflussen. Daher wurden verschiedene Blendendurchmesser zur Belichtung

der Kalotte getestet, um die applizierte Lichtmenge zu variieren. Daraufhin kamen bei den Jungtieren Blenden mit einem Durchmesser von 1,5 mm zum Einsatz. Bei den Tieren hohen Lebensalters wurden Blenden mit einem Durchmesser von 2,4 mm verwendet, um die einfallende Lichtmenge zu erhöhen.

Generierung extrazellulärer Feldpotenziale

In dieser Studie wurden extrazelluläre Feldpotentialmessungen nach afferenter Stimulation im Gehirnschnitt durchgeführt, um die kortikale Erregbarkeit und funktionale Inhibition in möglichst ausgedehnten Arealen zu erfassen. Diese Methode erlaubt, in relativ kurzer Zeit eine große Anzahl von Messungen durchzuführen. Angesichts der begrenzten Schnittdicke ist die Aussage ausschließlich auf lokale neuronale Schaltkreise beschränkt. Die Stimulation afferenter Fasern in Schicht VI verursacht exzitatorische und inhibitorische postsynaptische Potenziale (EPSP's bzw. IPSP's) an den innervierten Neuronen. Die postsynaptischen Potenziale verlaufen im Gegensatz zu Aktionspotentialen (1 – 2 ms Dauer) vergleichsweise träge (10 – 100 ms Dauer) und können als extrazelluläre Feldpotenziale registriert werden. Bei der Ausbildung der postsynaptischen Potentiale entsteht aufgrund der vorrangigen Lokalisation exzitatorischer Synapsen am apikalen Dendriten und inhibitorischer Synapsen am Perikaryon des Pyramidenneurons (Fritschy et al. 1998; Somogyi et al. 1998) ein neuronaler Dipol. Die am Apikaldendriten der Pyramidenzellen ausgelösten EPSP's verursachen die Depolarisation der Zellmembran. Die apikaldendritische Membran ist im Vergleich zur somatischen Membran zu diesem Zeitpunkt extrazellulär negativ geladen (→ Dipol). Die neuronalen Dipole können sich durch die parallele und vertikale Anordnung der Pyramidenzellen summieren. Dieses elektrotonische Kraftpotential lässt elektrische Ladungsträger im elektrischen Feld wandern. Der Stromfluss kann mit Hilfe von Mikroelektroden abgeleitet werden. Die Dipole der Interneurone löschen sich durch die unregelmäßige Orientierung der Dendriten teilweise gegenseitig aus und werden in der Messung nicht erfasst. Die Sequenz intrazellulär abgeleiteter synaptischer Potentiale von

Pyramidenzellen der Schicht II/III spiegelt nach afferenter Stimulation den zeitlichen Verlauf der extrazellulär abgeleiteten Feldpotentiale sehr gut wider (Metherate and Ashe 1995). Anhand der dargestellten Messungen darf eine Aussage über das Ausmaß der globalen Erregung der Pyramidenzellen nach afferenter Stimulation abgeleitet werden. Das Zusammenspiel von exzitatorischen und inhibitorischen Elementen in neuronalen Schaltkreisen kann durch Doppelpulsstimulation untersucht werden. Die erste Stimulation (konditionierender Stimulus) aktiviert neben den exzitatorisch vermittelten Summenfeldpotenzialen ($fEPSP_1$) auch die inhibitorischen Komponenten des neuronalen Netzwerkes. Die Pyramidenzellen werden durch die im kurzen Abstand folgende zweite Stimulation (Teststimulus) weniger depolarisiert. Aus diesem Grund sind die resultierenden $fEPSP_2$ kleiner als die $fEPSP_1$ (funktional inhibiert). Die frühe Phase dieser reduzierten Erregbarkeit (10 – 100 ms), mit einem Maximum bei 20 ms, wird im Kortex und im Hippokampus der Ratte hauptsächlich durch $GABA_A$ -Rezeptoren vermittelt (Kapur et al. 1989; Rozas et al. 2001). In der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung diente die Generierung extrazellulärer Feldpotentiale im Gehirnschnitt durch Doppelpulsstimulation der Analyse der über $GABA_A$ -Rezeptoren vermittelten kortikalen funktionalen Inhibition.

Immunhistochemie und relative optische Dichte

Die immunhistochemische Markierung von Proteinen ist gegenwärtig die beste Methode, um deren Verteilung im Gehirnschnitt hochauflösend darzustellen. Die Technik der Antigen-Demaskierung wurde angewandt, um die Reduktion unspezifischer Bindungen und die Entmaskierung der Rezeptorepitope für die Markierung zu erreichen (Fritschy et al. 1998). Die Pikrinsäure wirkt dabei als Oxidationsmittel und verhindert unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers. Die Antikörper-Bindungsstellen der Proteine (Antigene) sind durch die Fixation mit Paraformaldehyd in ihrer räumlichen Struktur verändert sowie maskiert und werden durch die Erhitzung in Zitronensäure wieder freigelegt. Zur Markierung der fünf $GABA_A$ -Rezeptoruntereinheiten dienten polyklonale

speziesspezifische Antikörper. Diese Antikörper wurden mittels synthetischer Proteine aus cDNA-Sequenzen der Ratte in Meerschweinchen generiert. Die Antikörper wurden von Fritschy und Kollegen mit Westernblots und der Immunopräzipitation getestet (Fritschy and Mohler 1995). Die immunhistochemische Behandlung resultiert in einer diffusen Färbung des Neuropils. GABAerge Synapsen sind nicht detektierbar da feine neuronale Strukturen wie Axone, Dendriten oder Zellmembranen aufgrund der Antigen-Demaskierung nur unscharf auflösbar sind (eigene Beobachtungen am Elektronenmikroskop, nicht dargestellt). Anhand der spezifischen immunhistochemischen Markierung ist es möglich, die Expressionsstärke des jeweiligen Proteins vergleichend zu untersuchen. Unterschiede der Expressionsstärke lassen sich mit Hilfe der relativen optischen Dichte des DAB-Präzipitates im Gehirnschnitt analysieren (Fritschy and Mohler 1995). Die sequenzielle Markierung verschiedener Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors in aufeinanderfolgenden Serienschnitten erlaubt Aussagen über dessen Untereinheitenzusammensetzung in verschiedenen Gehirnarealen (Redecker et al. 2000).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Altersbedingte zerebrale Plastizität

Während dem Reifungsprozess im juvenilen Entwicklungsstadium treten im Kortex ausgeprägte plastische Veränderungen auf. In dieser Zeit werden afferente Signale mit hoher Intensität verarbeitet. Eine große Anzahl kortikaler Neurone wird durch eine noch größere Anzahl Synapsen zu individuellen neuronalen Schaltkreisen verknüpft. In diesem neuronalen Netzwerk werden Informationen in Form von exzitatorischen Signalen integrativ verarbeitet. Zeitverzögert setzt die Reifung der synaptischen Inhibition ein (Luhmann and Prince 1991; Guo et al. 1997). Durch das plastische Zusammenspiel von Exzitation und Inhibition entsteht nach und nach ein stabiles neuronales Netzwerk. Scheinbar entwickeln sich in Kortexschicht IV inhibitorische feed-forward Schaltkreise, die den afferenten Informationstransfer in andere Kortexschichten regulieren (Brumberg et

al. 1999; Porter et al. 2001). Während der Reifung des okzipitalen Kortex der Ratte bilden sich diese Schaltkreise ab der dritten postnatalen Woche aus und kontrollieren den afferenten Eingang der Kortexschicht III. Der inhibitorische Einfluss manifestiert sich in einer zunehmenden funktionalen Inhibition und einer nachlassenden LTP in Schicht III bei afferenter Stimulation in Schicht VI (Rozas et al. 2001). Die vorliegende Studie zeigte, dass die dargestellten plastischen Veränderungen nicht auf die adoleszente Gehirnreifung beschränkt sind, sondern in der weiteren Lebensspanne arealspezifische Veränderungen aufweisen. Im okzipitalen, sensomotorischen und auditorischen Kortex der Tiere hohen Lebensalters verkleinerte sich die Größe der Summenfeldpotenziale und das Ausmaß der funktionalen Inhibition bei afferenter Stimulation.

Die um etwa 30 % kleineren Summenfeldpotenziale ($fEPSP_1$) bei den Ratten hohen Lebensalters spiegeln altersbedingte Veränderungen neuronaler Schaltkreise wider und stehen mit bisherigen Erkenntnissen im Einklang. So weisen kortikale Pyramidenzellen von Rhesusaffen und Ratten in hohem Lebensalter 30 – 40 % weniger dendritische Dornen im Bereich der apikalen und basalen Dendriten auf (Wong et al. 2000; Duan et al. 2003; Kolb et al. 2003), was die Anzahl möglicher exzitatorischer Synapsen vermindert (Wenk et al. 1991; Ossowska et al. 2001; Hof et al. 2002). Die neuronalen Schaltkreise und Funktionen bleiben trotz dem Verlust exzitatorischer Synapsen intakt. Das ist ein Zeichen für ausgereifere neuronale Schaltkreise, die zeitlebens an wechselnde Umweltbedingungen angeglichen werden. Die Anzahl der aktiven synaptischen Verbindungen nimmt ab, da sich effektive neuronale Schaltkreise mit weniger synaptischen Verbindungen präziser ausbilden können („Feinabstimmung“). Die Synapsenstruktur ändert sich in Hinblick auf eine effektivere Übertragung (Tamaru et al. 1991; Rosenzweig and Barnes 2003; Chapman 2005). Es ist naheliegend, dass die altersbedingt verkleinerten Summenfeldpotenziale der Pyramidenzellen bei afferenter Stimulation durch eine verminderte exzitatorische synaptische Innervation bedingt sind.

Durch den verminderten synaptischen Input integrieren die Pyramidenzellen weniger Rezeptorpotenziale, sind weniger aktiv und verlieren an Volumen (Wong et al. 2000; Luebke et al. 2004). Das ist ein wichtiger Vorteil aufgrund der Einschränkung des neuronalen Energieverbrauchs. Somit nimmt der neuronale Metabolismus (Deshmukh and Patel 1982; Leenders et al. 1990; Wree et al. 1991) und der zerebrale Blutfluss mit zunehmenden Alter ab (Gur et al. 1987; Berman et al. 1988). Die NeuN-Färbung der vorliegenden Studie unterstützt diese Hypothese. Das NeuN-spezifische Antigen wird nur in ausdifferenzierten Nervenzellen exprimiert und dessen Expressionslevel korreliert positiv mit der metabolischen Aktivität der Zellen (Mullen et al. 1992; Weiler et al. 2005). Es gibt derzeit keine eindeutigen Hinweise auf eine altersbedingt reduzierte Neuronenanzahl im Kortex der Ratte (Morrison and Hof 1997). Die abnehmenden ROD-Werte der NeuN-Immunreaktivität in den Kortexarealen mit verkleinerten Feldpotenzialamplituden könnten somit als ein Anzeichen veränderter metabolischer Aktivität neuronaler Zellen im Alter angesehen werden. Die nachlassende neuronale Interaktion könnte mit der geringeren Agilität und Aktivität, den nachlassenden sozialen Kontakten sowie dem verminderten Erkundungsdrang bei Ratten hohen Lebensalters zusammenhängen (Andersen et al. 1999).

Es erscheint naheliegend, dass die altersbedingt verminderte exzitatorische neuronale Kommunikation durch modulierte inhibitorische Mechanismen kompensiert wird, um ein funktionell ausgewogenes Verhältnis zwischen Exzitation und Inhibition zu schaffen. Eine Veränderung der neuronalen Inhibition kann unter anderem durch die Modulation postsynaptischer GABA_A-Rezeptoren realisiert werden. In früheren Studien wurde eine reduzierte aber nicht signifikante ³[H]Muscimolbindung im Kortex alter Ratten und Affen gezeigt, was eine unveränderte Anzahl von GABA_A-Rezeptoren im hohen Lebensalter nahelegt (Wenk et al. 1991). Weiterhin wird die Rezeptorfunktion durch Verschiebungen des Verhältnisses der Untereinheiten innerhalb des heteropentamer aufgebauten GABA_A-Rezeptors moduliert (Brooks-Kayal et al. 1998; Brooks-Kayal et al.

2001; Mohler et al. 2001). Der Aufbau des Rezeptors hat einen entscheidenden Einfluss auf seine synaptische oder extrasynaptische Lokalisation (Mohler et al. 2004; Li et al. 2005). In dieser Studie wurde die Expression postsynaptischer GABA_A-Rezeptoruntereinheiten und der funktionelle Einfluss der über GABA_A-Rezeptoren vermittelten Inhibition untersucht, um den Veränderungen des inhibitorischen Systems weiter auf den Grund zu gehen. Es konnte eine altersbedingte Modulation in Form einer erhöhten Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sowie einer verminderten Expression der Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ bei den Tieren hohen Lebensalters gezeigt werden.

Die elektrophysiologisch erhobenen Daten dieser Studie geben Hinweise auf ein verändertes funktionelles Gewicht der Rezeptoren im hohen Lebensalter. Es ist ein deutlicher Abfall der funktionalen Inhibition innerhalb der lokalen kortikalen neuronalen Schaltkreise gezeigt worden. Bei Ratten hohen Lebensalters könnte die Modulation der lokalen Inhibition der verschlechterten sensomotorischen Performance und der veränderten kortikalen topographischen Organisation zugrunde liegen (Spengler et al. 1995; Dinse 2005). Die verminderte Inhibition lässt eine gewisse Korrelation mit der veränderten Expression an $\alpha 2$ - und $\alpha 5$ -Rezeptoruntereinheit erkennen. Die $\alpha 5$ -Untereinheit ist an den dendritischen Dornen in extrasynaptisch lokalisierten Rezeptoren vertreten und damit besonders für die Modulation des über NMDA-Rezeptoren vermittelten exzitatorischen Inputs geeignet (Fritschy et al. 2003). Die restlichen in dieser Studie untersuchten Untereinheiten sind hauptsächlich in synaptisch lokalisierten Rezeptoren eingebaut (Mohler et al. 2004; Li et al. 2005). Demnach verändert sich im hohen Lebensalter das Verhältnis zwischen der präzisen synaptisch vermittelten und der diffusen extrasynaptisch vermittelten Inhibition. Die schichtspezifische Veränderung der Rezeptorexpression ist ein Indiz für die permanente Modulation der synaptischen Verschaltung und des inhibitorischen Systems.

Die Modulation der über GABA_A-Rezeptoren vermittelten Inhibition im hohen Lebensalter hat große klinische Relevanz. Der GABA_A-Rezeptor ist Angriffspunkt vieler Pharmaka, z.B. der Benzodiazepine, Barbiturate, Neurosteroiden, Antikonvulsiva und Anästhetika (Amin et al. 1997; Mehta and Ticku 1999; Rudolph et al. 2001). Die Benzodiazepine üben einen positiv allosterischen Einfluss auf die Bindungsaffinität von GABA aus. Der Bindungstyp I der Benzodiazepine wird durch die α 1-Untereinheit vermittelt. Der Bindungstyp II ist zum einen durch die α 2-Untereinheit und/oder α 3-Untereinheit (Typ II_M) und zum anderen durch die α 5-Untereinheit (Typ II_L) bedingt (Ruano et al. 1994; Mehta and Ticku 1999). Bei der Wechselwirkung solcher Medikamente mit den entsprechenden Rezeptoruntereinheiten ändert sich die Chloridleitfähigkeit der Rezeptoren. Die einzelnen Bindungstypen weisen Benzodiazepin-Affinitäten mit folgender Einteilung auf: Typ I > Typ II_M > Typ II_L. Die altersbedingten Verschiebungen des Verhältnisses der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten lassen auf eine Modulation der Benzodiazepin-Bindungsstelle im Kortex schließen. Das spiegelt die differenten Wirkungen verschiedener Benzodiazepin-Dosen bei Patienten oder Ratten niedrigen bzw. hohen Lebensalters wider und bietet einen Erklärungsansatz für die Nebenwirkungen von Medikamenten mit Wirkung an GABA_A-Rezeptoren im hohen Lebensalter (Barnhill et al. 1990; Ashton 1994; Wikinski et al. 2001; Giardino et al. 2002).

Altersbedingte Reaktionen auf eine fokale kortikale Läsion

Die endgültigen Folgen eines Schlaganfalls werden maßgeblich von den läSIONSINDUZIERTEN günstigen und schädigenden Prozessen im Gehirn bestimmt. Diese Prozesse beeinflussen das Ausmaß a) des initialen Schadens b) der Funktionserholung c) der kompensatorischen Strategien und d) der bleibenden Schäden (Nudo 1999). Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie zeigen, dass verschieden alte Tiere differente Ausgangsbedingungen für die Funktionserholung nach einem Schlaganfall vorweisen. Weiterer Klärung bedarf, inwieweit sich die altersbedingten Modulationen der

intrakortikalen Verschaltungen auf die neuronalen Entwicklungen nach einer photothrombotisch induzierten kortikalen Läsion auswirken. In dieser Studie konnten entscheidende Unterschiede zwischen Tieren hohen und niedrigen Lebensalters gezeigt werden. Nach afferenter Stimulation waren bei den Tieren niedrigen Lebensalters die Summenfeldpotenziale ($fEPSP_1$) läsionsbedingt bilateral verkleinert. Im Gegensatz dazu blieben die $fEPSP_1$ bei den Tieren hohen Lebensalters von einer Läsion unbeeinflusst. Bei den jungen Tieren nahm dagegen die funktionale Inhibition bilateral ab. Die funktionale Inhibition war bei den Tieren hohen Lebensalters im Randgebiet der Läsion stark erhöht.

Bei jungen Tieren wurden nach kortikalen Läsionen schon in früheren Untersuchungen verkleinerte Summenfeldpotenziale beobachtet (Buchkremer-Ratzmann et al. 1996; Neumann-Haefelin and Witte 2000). Diese Verkleinerungen der Feldpotentiale stehen mit der läsionsbedingt reduzierten Anzahl an dendritischen Dornen der Pyramidenzellen in den Kortexschichten II/III und V im ipsi- und kontralateralen Kortex (Kolb et al. 1997; Johansson and Belichenko 2002; Zhang et al. 2005b) sowie mit der bilateral reduzierten Transkription metabotroper Glutamatrezeptoren im Einklang (Keyvani et al. 2001). Analog dem altersbedingten Abbau exzitatorischer neuronaler Verbindungen würde der läsionsbedingte Verlust dieser Verbindungen die afferent ausgelösten Summenfeldpotenziale verkleinern. Untersuchungen zur Dichte der dendritischen Dornen und zum zerebralen Metabolismus nach kortikalen Läsionen stehen bislang bei Ratten hohen Lebensalters aus. Wegen der reduzierten NMDA-vermittelten metabolischen Reaktionen der Nervenzellen (Gonzales et al. 1991) ist es bei Ratten hohen Lebensalters möglich, dass durch einen ischämischen Infarkt induzierte exzitatorische Prozesse einen geringeren initialen Gewebeschaden verursachen. Dafür spricht auch die in dieser Studie beobachtete reduzierte Induzierbarkeit photothrombotischer Läsionen bei den Ratten hohen Lebensalters. Bei den läsionierten Ratten hohen Lebensalters sind die weitgehend unveränderten $fEPSP_1$ möglicherweise durch einen weniger massiven und weniger

globalen Niedergang der dendritischen Dornen und exzitatorischen Verbindungen nach ischämischen kortikalen Läsionen bedingt. Experimente von Shapira und Kollegen bestätigen dies (Shapira et al. 2002). Sie zeigten, dass bei Ratten hohen Lebensalters weniger starke postläsionelle funktionelle Akutschäden auftreten als bei Jungtieren. Andere Studien bestätigen ebenfalls unterschiedliche initiale Reaktionsmechanismen bei jungen und alten Ratten (Kesslak et al. 1995; Sutherland et al. 1996; Badan et al. 2003a; Badan et al. 2003b; Rosen et al. 2005).

Die funktionale Inhibition ist bei den Ratten niedrigen Lebensalters läsionsbedingt bilateral vermindert und geht mit einer modulierten Expression der GABA_A-Rezeptoren in beiden Hemisphären einher. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Publikationen (Domann et al. 1993; Buchkremer-Ratzmann et al. 1996; Reinecke et al. 1999; Redecker et al. 2002). Die reduzierte Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$ korreliert mit der läsionsbedingt abnehmenden Transkription (Lu et al. 2004). Die Expressionsänderungen der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\gamma 2$ sind im ipsi- und kontralateralen Kortex entgegengesetzt. Weiterhin tritt ausschließlich im ipsilateralen Kortex eine Gliazellaktivierung auf. Die Änderungen der funktionalen Inhibition in der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre mögen somit unterschiedliche Ursachen haben. Neueste Untersuchungen an Tiermodellen und an Schlaganfallpatienten unterstützen die Hypothese, dass die Regeneration der ischämiebedingt gestörten Funktionen primär in den läsionsangrenzenden Arealen der ipsilateralen Hemisphäre stattfindet (Whishaw and Metz 2002; Ward et al. 2003a, b; Schmidlin et al. 2004; Shanina et al. 2006). In diesen Bereichen vollzieht sich eine kortikale Reorganisation, welcher ähnliche Mechanismen wie bei Lernprozessen zugrunde liegen (Castro-Alamancos et al. 1995; Hagemann et al. 1998; Neumann-Haefelin et al. 1998; Schiene et al. 1999; Reinecke et al. 2003). Die kontralateralen Veränderungen könnten unter anderem durch ein läsionsbedingt verändertes Verhalten verursacht sein. So wurde nach kortikalen Läsionen im Vorderpfotenareal von Ratten ein Händigkeitwechsel und die verstärkte Benutzung der gesunden Pfote beobachtet

(Biernaskie and Corbett 2001; Teskey et al. 2003). Diese Reaktion bedingt das Lernen neuer motorischer Funktionen und führt zu kortikaler Plastizität in der kontralateralen Hemisphäre (Jones and Schallert 1994; Luke et al. 2004). Zusätzlich sind kompensatorische Mechanismen an der Erholung nach kortikalen Läsionen beteiligt, die ebenfalls das Lernen neuer Funktionen und die Reorganisation neuronaler Schaltkreise im kontralateralen Kortex bedingen (Metz et al. 2005). Die bilateral reduzierte Inhibition im vertikalen kortikalen Netzwerk ist eine Voraussetzung für die Reorganisation der horizontalen kortikalen Verbindungen in den oberen Kortexschichten (Hess et al. 1996). Diese werden durch das Lernen neuer Funktionen (Riout-Pedotti et al. 1998) sowie nach kortikalen Läsionen (Reinecke et al. 2003) bei jungen Ratten induziert. Ein morphologischer Grund für die läsionsbedingt bilateral verminderte funktionale Inhibition kann die Deafferenzierung transkallosaler Verbindungen sein. Solche Verbindungen werden bei jungen Ratten ausgehend von den Kortexschichten II/III und V gebildet (Giannetti et al. 1999; Horvath et al. 2005). Elektrophysiologische und morphologische Studien nach kallosalen Transektionen bestätigen die Interaktion beider Hemisphären (Bloom and Hynd 2005). Diese Interaktion spielt eine entscheidende Rolle bei der kortikalen Plastizität während Verhaltensänderungen (Bury et al. 2000; Adkins et al. 2002). Grundsätzlich kann ein Einfluss der ipsilateralen Erregbarkeitsänderungen auf die kontralateralen neuronalen Schaltkreise durch transkallosale Verbindungen bei jungen Ratten nicht ausgeschlossen werden (Buchkremer-Ratzmann and Witte 1997).

Bei den Ratten hohen Lebensalters ist die funktionale Inhibition läsionsbedingt in der Infarktumgebung verstärkt. In der kontralateralen Hemisphäre zeigt sich eine tendenzielle, sehr geringe Zunahme der funktionalen Inhibition. Eine verstärkte funktionale Inhibition konnte bei Ratten niedrigen Lebensalters bis zu 60 Tage nach der Läsion nicht beobachtet werden (Domann et al. 1993). Daher scheint diese Reaktion speziell bei Ratten hohen Lebensalters einzutreten. Die Expression der untersuchten GABA_A-Rezeptoruntereinheiten ist wie bei den jungen Ratten bilateral, aber mit anderem Muster

und teilweise stärker reguliert. Die Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten ist bei den Ratten niedrigen Lebensalters läsionsbedingt über längere Zeit vermindert (Redecker et al. 2002). Bei den Tieren hohen Lebensalters findet man neben der verminderten Expression der Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ eine teilweise verstärkte Expression der Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$. Die bilateral modulierte Rezeptorexpression spricht für eine globale Reaktion des läsionierten Gehirns. Die stärkere Modulation der Rezeptorexpression bei den Tieren hohen Lebensalters könnte die verschiedenen elektrophysiologischen Reaktionen bedingen. Eine kortikale Läsion verschiebt das Gleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition bei Ratten hohen Lebensalters vermutlich auf eine andere Weise als bei jungen Tieren.

Es ist bekannt, dass das läsionsbedingte Axonwachstum (Needels et al. 1986) und die reaktive Synaptogenese im Alter reduziert sind (Nieto-Sampedro and Nieto-Diaz 2005). Ratten hohen Lebensalters zeigen eine beschleunigte Narbenbildung, welche die Funktionserholung nach kortikalen Läsionen behindert (Badan et al. 2003a; Hoane et al. 2003). Dies verhält sich adäquat zu der altersbedingt verstärkten GFAP-Immunreaktivität in dieser Studie. Das Gliagewebe setzt sich aus mehreren Zelltypen zusammen. Die Astroblasten begünstigen das Axonwachstum (Tomaselli et al. 1988). Dagegen hemmen die fibrillären reaktiven Astrozyten das axonale Wachstum (Bovolenta et al. 1997). Demnach bestimmt die Zusammensetzung des Gliagewebes dessen Einfluss auf das axonale Wachstum. Das Verhältnis der unterschiedlichen Zelltypen ändert sich im Alter zugunsten der fibrillären Astrozyten, wodurch das axonale Wachstum behindert wird (Sandell and Peters 2002). Das Lernen hat aufgrund von Anpassungsmechanismen an veränderte Umweltbedingungen bei Ratten hohen Lebensalters einen verminderten Einfluss auf die Ausbildung dendritischer Dornen und die dendritische Verzweigungen von Pyramidenzellen in der Kortexschicht II/III (Kolb et al. 2003). Nach der Hemmung des Axonwachstumsinhibitors Nogo-A zeigten Ratten hohen Lebensalters im Vergleich mit jungen Ratten eine erheblich bessere Funktionserholung (Markus et al. 2005). Es

erscheint daher möglich, dass die Modulation neuronaler Netzwerke bei Ratten hohen Lebensalters in stärkerem Maße auf dem Niveau bestehender Synapsen stattfindet. Dagegen werden bei Tieren niedrigen Lebensalters vermehrt neue Verbindungen geknüpft.

In dieser Studie ist die NeuN-Immunreaktivität läsionsbedingt in beiden Altersgruppen bilateral verstärkt. Das legt in beiden Versuchsgruppen eine bilateral erhöhte neuronale Aktivität nahe. Durch zusätzliche Aktivierung des läsionsangrenzenden Kortex mittels elektrischer Stimulation wird die Funktionserholung positiv beeinflusst (Adkins-Muir and Jones 2003; Kleim et al. 2003). Die verstärkte neuronale Aktivität würde einen erhöhten zerebralen Blutfluss induzieren. Tatsächlich konnte mittels fMRT-Untersuchungen bei Ratten niedrigen Lebensalters ein erhöhter zerebraler Blutfluss nachgewiesen werden (Dijkhuizen et al. 2003). Die Tiere hohen Lebensalters weisen nach der Läsion eine stärkere Aktivierung der NeuN-Immunreaktivität auf, was durch eine im Vergleich zu Jungtieren verstärkte neuronale Aktivität verursacht sein könnte. Dieser Befund korreliert mit der Beobachtung, dass läsionsbedingte epileptische Aktivität verstärkt bei Ratten hohen Lebensalters auftritt (Kelly et al. 2001). Die erhöhte funktionale Inhibition könnte daher ein Mechanismus sein, um dieser epileptischen Aktivität entgegenzuwirken.

Warum sind die Veränderungen der funktionalen Inhibition bei den Tieren hohen Lebensalters weniger deutlich bilateral ausgeprägt? Die Anzahl transkallosaler Verbindungen ist im hohen Lebensalter vermindert und der interhemisphärische Informationsfluss wird intrakortikal anders verarbeitet (Vaughan and Cahill 1984; Morio et al. 1992; Seitz and Freund 1997). Das hat einen Einfluss auf die läsionsbedingte Interaktion beider Hemisphären und könnte zu den unterschiedlichen Reaktionen bei jungen und alten Ratten führen. Bislang wurde in keiner Studie die Händigkeit alter Ratten untersucht. Setzt man voraus, dass die alten Ratten nach kortikalen Läsionen ebenfalls auf Funktionen der kontralateralen Seite ausweichen, würde man aufgrund der

Verhaltensänderung auch kontralaterale Veränderungen der funktionalen Inhibition erwarten. Beim Menschen lässt die Händigkeit mit zunehmendem Alter deutlich nach. Untersuchungen am motorischen System zeigten, dass ältere Versuchspersonen, im Gegensatz zu jungen Versuchspersonen, beide Hände gleich gut einsetzen können (Kalisch et al. 2005). Weiterhin induziert motorisches Training bei Versuchspersonen zunehmenden Alters bedeutend weniger kortikale Plastizität (Sawaki et al. 2003). Demnach hätte das Ausweichen auf die gesunde Pfote bei Ratten hohen Lebensalters weniger Auswirkungen auf die funktionale Inhibition in der kontralateralen Hemisphäre.

Rekapitulation eines juvenilen Musters?

Trotz den altersbedingt verschiedenen Ausgangsbedingungen und den unterschiedlichen postläsionalen Reaktionen weisen Ratten hohen Lebensalters eine gewisse Genesung der läsionsinduzierten Defizite auf (Andersen et al. 1999; Shapira et al. 2002; Brown et al. 2003; Wang et al. 2003; Markus et al. 2005; Zhang et al. 2005a). Demnach sind Gehirne hohen Lebensalters zu plastischer Reorganisation befähigt und es ist denkbar, dass die in dieser Studie beobachteten Prozesse einen Beitrag dazu leisten.

Es gibt viele Hinweise aus klinischen und tierexperimentellen Studien, dass in adulten Gehirnen zeitweilig gewisse „juvenile“ Mechanismen induziert werden, um plastische Veränderungen zu ermöglichen (Cramer and Chopp 2000). Solch eine Reorganisation des neuronalen Netzwerkes wird durch kortikale Läsionen begünstigt. Ratten jungen Lebensalters sind nach einer kortikalen Läsion besser in der Lage, motorische Bewegungsabläufe mit der gesunden Pfote zu lernen, da die Läsion verstärkt Synaptogenese im kontralateralen Kortex induziert (Luke et al. 2004). Auch äußere Einflüsse beeinflussen die neuronale Plastizität. Beispielsweise korreliert einerseits die altersbedingte Restrukturierung kortikaler rezeptiver Felder mit der eingeschränkten motorischen Performance (Spengler et al. 1995). Andererseits korreliert die Verbesserung der Performance alter Ratten in reizreicher Umgebung mit einer Restauration der rezeptiven Felder (Churs et al. 1996; Reinke and Dinse 1996). Eine Restauration

altersbedingter Veränderungen nach kortikaler Läsion konnte auf der Ebene des GABA-Rezeptors auch in dieser Studie beobachtet werden. Die altersbedingt in oberen Kortexschichten verminderte Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$ wird nach einer kortikalen Läsion wieder verstärkt. Die altersbedingt in tiefen Kortexschichten verstärkte Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ wird nach der kortikalen Läsion vermindert. Gleichzeitig nimmt die altersbedingt reduzierte funktionale Inhibition wieder zu. Im läsionsangrenzenden sensomotorischen Areal der Ratten hohen Lebensalters ist diese Entwicklung besonders deutlich ausgeprägt (Abb. 20).

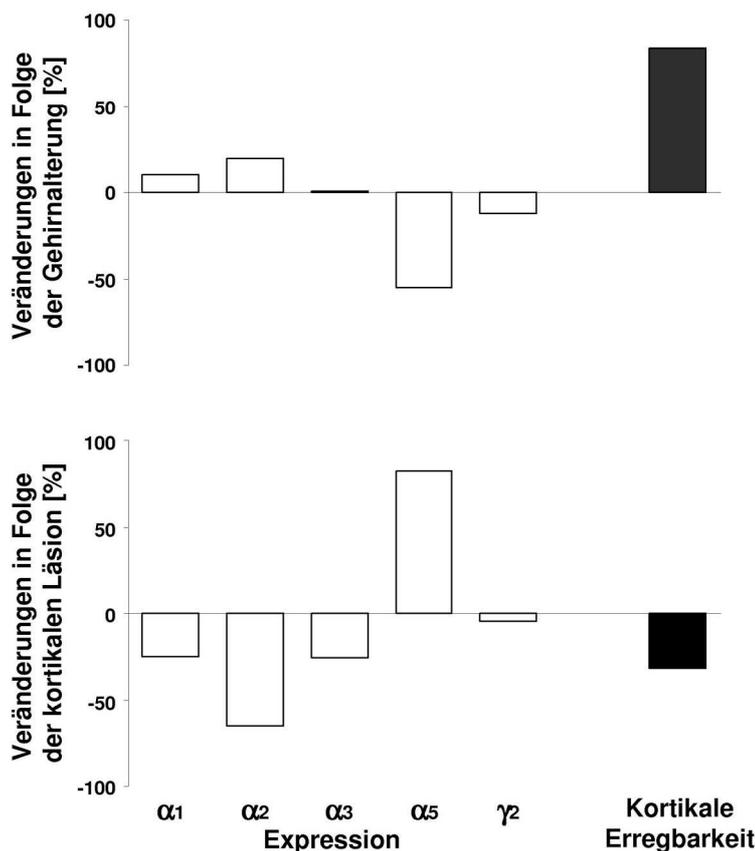


Abb. 20: Modulation des GABAergen Systems in Folge der Gehirnalterung sowie nach kortikalen Läsionen. Dargestellt ist die Veränderung der Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten (weiße Balken) und der kortikalen Erregbarkeit ($Q = f \text{ EPSP}_2 / f \text{ EPSP}_1$, schwarze Balken) im sensomotorischen Areal der Ratte. Der obere Graph veranschaulicht die Modulationen während der Alterung: Die Expression der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ ist bei alten Ratten erhöht, die Expression der Untereinheiten $\alpha 5$ und $\gamma 2$ ist altersbedingt erniedrigt. Gleichzeitig ist die kortikale Erregbarkeit im Alter erhöht. Der untere Graph veranschaulicht die Veränderungen nach einer kortikalen Läsion bei Ratten hohen Lebensalters: Die Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\gamma 2$ sind läsionsbedingt vermindert exprimiert, die Untereinheit $\alpha 5$ ist läsionsbedingt verstärkt exprimiert. Gleichzeitig ist die kortikale Erregbarkeit erniedrigt. Die Darstellung zeigt, dass die läsionsbedingten Modulationen zu den altersbedingten Veränderungen des neuronalen Netzwerkes gegenläufig sind. Eventuell begünstigt diese Reaktion die Funktionserholung nach der Läsion. Das könnte bedeuten, dass nach kortikaler Schädigung ein juveniles Muster induziert wird um eine plastische Reorganisation des neuronalen Netzwerkes zu begünstigen.

4.3 Schlussfolgerungen

Diese Studie unterstreicht, dass das Gehirn bis ins hohe Lebensalter ein Organ mit plastischer Struktur ist. Daraus ergeben sich altersbedingte Unterschiede in der Anatomie und der Physiologie. Das ist beim Menschen ebenso der Fall wie bei Mäusen, Ratten, Katzen oder Affen. Es ist hilfreich, diese Veränderungen am Tiermodell zu untersuchen und die gewonnenen Erkenntnisse bei der Erforschung des weitaus komplexeren menschlichen Gehirns zu berücksichtigen.

Die altersbedingt unterschiedlichen läsionsinduzierten Reaktionen der GABA_A-Rezeptorexpression und der funktionalen Inhibition zeigen, dass Erkenntnisse die an jungen Tieren gewonnen wurden nicht ohne weiteres auf Tiere hohen Lebensalters übertragen werden können. Möglicherweise haben bei Ratten niedrigen Lebensalters erfolgreiche therapeutische Maßnahmen bei Ratten hohen Lebensalters den gegenteiligen Effekt. Andererseits zeigen Ratten beider Altersgruppen nach zerebralen Schädigungen eine Funktionserholung. Es ist anzunehmen, dass die verschiedenartigen Reaktionen bei Ratten niedrigen und hohen Lebensalters dem gleichen Zweck dienen. Im Rahmen der Schlaganfallforschung am Tiermodell ist es daher wichtig, die gewonnenen Erkenntnisse mit dem Lebensalter und dem aktuellen Entwicklungsstand der läsionierten Versuchstiere zu koppeln.

Die allgemeine Auffassung – das Gehirn entwickelt sich mit zunehmendem Alter zu einer starren Struktur mit verminderter Plastizität – trifft nicht vollständig zu. Es gibt Mechanismen, die das Gehirn auch im hohen Lebensalter schlagartig aus der starren Organisation lösen und wie in der Jugend modulierbar machen. Diese Mechanismen müssen weiter erforscht werden, um sie für die breite Anwendung greifbar zu machen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Schlaganfall ist eine multifaktoriell bedingte, aber vorrangig altersabhängige Krankheit. Durch den Fortschritt in Medizin und Technik steigt die Zahl der einen Schlaganfall überlebenden Patienten stetig an. Daraus resultiert eine starke und ernst zu nehmende wirtschaftliche Belastung des Systems und der betroffenen Personen. Die schnelle Rehabilitation und gesellschaftliche Integration ist nach der Akutbehandlung ein wichtiges Ziel. Die Mechanismen der Funktionserholung nach einem Schlaganfall werden an zahlreichen Tiermodellen intensiv erforscht. Ratten besitzen ein enormes Potential, um Schädigungen des Gehirns zu regenerieren. An diesem Modell konnten viele interessante Erkenntnisse gewonnen werden. So verändert sich das Gleichgewicht zwischen erregenden und hemmenden Signalen, um die bestehende stabile Struktur des neuronalen Netzwerkes aufzulösen und neu zu formieren. Der überwiegende Teil der Erkenntnisse stammt aus Versuchen mit jungen Tieren. Das könnte ein Grund sein, warum sich die Ergebnisse der tierexperimentellen Studien nur selten in der Klinik umsetzen lassen.

Aufgabe der vorliegenden Studie war es einerseits, die Interaktion von inhibitorischen und exzitatorischen Elementen des kortikalen Netzwerkes an Ratten niedrigen und hohen Lebensalters (3 und 24 Monate) vergleichend zu untersuchen. Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich eine kortikale Läsion 7 Tage nach Läsionsinduktion auf das Zusammenspiel von inhibitorischen und exzitatorischen Elementen in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere auswirkt. Das Zusammenspiel von inhibitorischen und exzitatorischen Elementen wurde *in vitro* mit Hilfe der Doppelpulsstimulation zur Ableitung kortikaler extrazellulärer Feldpotentiale in 400 µm dicken frontalen Gehirnschnitten untersucht. Dabei wurde der Kortex in Schicht VI mit einer bipolaren Elektrode stimuliert. Der Abstand der beiden 50 µs Reize betrug 20 ms, um die über GABA_A-Rezeptoren vermittelte Inhibition zu erfassen. Die hauptsächlich durch exzitatorische postsynaptische

Potentiale generierten Summenantworten ($fEPSP_1$ bzw. $fEPSP_2$) der orthodrom stimulierten Pyramidenzellen wurden in Schicht II/III der gleichen Kolumne abgeleitet. Anhand des Verhältnisses der Größe der zwei resultierenden Feldpotenzialantworten konnte eine Aussage über die Stärke inhibitorischer Komponenten (funktionale Inhibition) lokaler neuronaler Schaltkreise getroffen werden. Die Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten α_1 , α_2 , α_3 , α_5 und γ_2 wurde immunhistochemisch untersucht. Die Zusammensetzung des Rezeptors hinsichtlich seiner Untereinheiten variiert je nach Lokalisation am Neuron und bestimmt dessen physiologische Eigenschaften. Im Zusammenhang mit den physiologischen Daten konnten Veränderungen des inhibitorischen Systems abgeschätzt werden. Kortikale Läsionen wurden photothrombotisch induziert. Bei dieser Methode verursacht ein intravenös injizierter Farbstoff in Folge von Lichteinwirkung Thrombozytenaggregation und die Okklusion hirnversorgender Gefäße. Diese nicht invasive Technik resultiert in lokalen Ischämien und Läsionen definierter Größe an vorher bestimmten Koordinaten.

Bei den Tieren hohen Lebensalters wurden rund 30 % kleinere $fEPSP_1$ gemessen. Die jungen Ratten weisen eine ausgeprägte funktionale Inhibition auf. Die Quotienten $Q = fEPSP_2 / fEPSP_1$ erreichten im Mittel einen Wert von $0,51 \pm 0,03$. Dieser Wert zeigt, dass die zweite Feldpotenzialantwort im Vergleich zur ersten Feldpotenzialantwort um die Hälfte reduziert (funktional inhibiert) ist. Die Tiere hohen Lebensalters weisen mit einem mittleren Quotient von $0,74 \pm 0,01$ eine wesentlich geringere funktionale Inhibition auf. Die zweite Feldpotenzialantwort erreicht rund drei viertel des Ausmaßes der ersten Feldpotenzialantwort. Die nachlassende funktionale Inhibition bei den Tieren hohen Lebensalters korreliert mit der altersbedingt verstärkten Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheit α_2 in den tiefen Kortexschichten und der verminderten Expression der Untereinheit α_5 in den oberen Kortexschichten. Die Expression der Untereinheit γ_2 ist altersbedingt reduziert, die Untereinheit α_1 wird altersbedingt verstärkt exprimiert. Die

Untereinheit $\alpha 3$ zeigt keine eindeutige altersbedingte Regulation. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich anatomische und physiologische Eigenschaften der neuronalen Verschaltung im Laufe des Lebens verändern.

Die Technik der Photothrombose induzierte unter identischen Bedingungen bei Tieren hohen Lebensalters kleinere Läsionen als bei Jungtieren. Daher wurde zur Läsionsinduktion bei den Tieren hohen Lebensalters eine größere Lichtmenge eingesetzt. Bei den läsionierten Jungtieren wurden ipsilateral um 30 % kleinere $fEPSP_1$ gemessen, kontralateral sanken die $fEPSP_1$ um 18 %. Dagegen blieben die $fEPSP_1$ bei den Tieren hohen Lebensalters von der Läsion unbeeinflusst. Die funktionale Inhibition war bei den läsionierten Jungtieren bilateral vermindert. Bei den Tieren hohen Lebensalters war die funktionale Inhibition im läsionsangrenzenden Areal stark erhöht. Auch im kontralateralen Kortex zeigte sich eine leicht verstärkte funktionale Inhibition. Die Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten war in beiden Altersgruppen bilateral moduliert. Das Ausmaß der Modulation zeigte bei den Ratten niedrigen Lebensalters eine deutlich schwächere Ausprägung. Die läsionsbedingt nachlassende funktionale Inhibition war bei den jungen Ratten überwiegend von einer verminderten Expression der untersuchten der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten begleitet. Die verstärkte funktionale Inhibition wurde bei den Tieren hohen Lebensalters von einer verstärkten Expression der Untereinheit $\alpha 5$ in oberen Kortexschichten und einer deutlich verminderten Expression der Untereinheit $\alpha 2$ in unteren Kortexschichten begleitet. Die läsionsinduzierten Veränderungen zeigten sich im Vergleich mit den altersbedingten Veränderungen größtenteils entgegengesetzt. So wird die altersbedingt nachlassende funktionale Inhibition läsionsbedingt erhöht. Weiterhin gleicht die kortikale Läsion das Expressionsniveau der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten dem Expressionsmuster der Ratten niedrigen Lebensalters an.

Ratten ungleichen Alters reagieren nach einer kortikalen Läsion aufgrund abweichender Ausgangsbedingungen mit teilweise gegensätzlichen Strategien. Trotzdem erholen sich die Tiere hohen Lebensalters adäquat von den Läsionsfolgen. Scheinbar dienen die verschiedenen Reaktionen dem gleichen Zweck. Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass die starre neuronale Verknüpfung auch im hohen Lebensalter gelöst werden kann und wie in der Jugend neu formbar wird.

6. ABKÜRZUNGEN

ABC	Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase
ACSF	artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit
ATP	Adenosintriphosphat
AU	auditorischer Kortex
DAB	Diaminobenzidin
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GFAP	glial fibrillary acidic protein
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
LA	Lebensalter
LTP	Langzeitpotenzierung
NeuN	neuronal nucleus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OX	okzipitaler Kortex
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
PFA	Paraformaldehyd
PT	Photothrombose
ROD	relative optische Dichte
SM	sensomotorischer Kortex
TMS	transkranielle Magnetstimulation

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Adkins DL, Bury SD and Jones TA.** Laminar-dependent dendritic spine alterations in the motor cortex of adult rats following callosal transection and forced forelimb use. *Neurobiol Learn Mem* 78: 35-52, 2002.
- Adkins-Muir DL and Jones TA.** Cortical electrical stimulation combined with rehabilitative training: enhanced functional recovery and dendritic plasticity following focal cortical ischemia in rats. *Neurol Res* 25: 780-788, 2003.
- Allard T, Clark SA, Jenkins WM and Merzenich MM.** Reorganization of somatosensory area 3b representations in adult owl monkeys after digital syndactyly. *J Neurophysiol* 66: 1048-1058, 1991.
- Alloway KD, Rosenthal P and Burton H.** Quantitative measurements of receptive field changes during antagonism of GABAergic transmission in primary somatosensory cortex of cats. *Exp Brain Res* 78: 514-532, 1989.
- Amin J, Brooks-Kayal A and Weiss DS.** Two tyrosine residues on the alpha subunit are crucial for benzodiazepine binding and allosteric modulation of gamma-aminobutyric acidA receptors. *Mol Pharmacol* 51: 833-841, 1997.
- Andersen MB, Zimmer J and Sams-Dodd F.** Specific behavioral effects related to age and cerebral ischemia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 62: 673-682, 1999.
- Artola A and Singer W.** Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature* 330: 649-652, 1987.
- Ashton H.** Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use. *Drugs* 48: 25-40, 1994.
- Back T, Ginsberg MD, Dietrich WD and Watson BD.** Induction of Spreading Depression in the Ischemic Hemisphere Following Experimental Middle Cerebral Artery Occlusion: Effect on Infarct Morphology. 16: 202-213, 1996.
- Back T.** Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol* 18: 621-638, 1998.
- Back T, Hemmen T and Schuler OG.** Lesion evolution in cerebral ischemia. *J Neurol* 251: 388-397, 2004.
- Badan I, Buchhold B, Hamm A, Gratz M, Walker LC, Platt D, Kessler C and Popa-Wagner A.** Accelerated glial reactivity to stroke in aged rats correlates with reduced functional recovery. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 845-854, 2003a.
- Badan I, Platt D, Kessler C and Popa-Wagner A.** Temporal dynamics of degenerative and regenerative events associated with cerebral ischemia in aged rats. *Gerontology* 49: 356-365, 2003b.

- Barnhill JG, Greenblatt DJ, Miller LG, Gaver A, Harmatz JS and Shader RI.** Kinetic and dynamic components of increased benzodiazepine sensitivity in aging animals. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 1153-1161, 1990.
- Baron JC, Cohen LG, Cramer SC, Dobkin BH, Johansen-Berg H, Loubinoux I, Marshall RS and Ward NS.** Neuroimaging in stroke recovery: a position paper from the First International Workshop on Neuroimaging and Stroke Recovery. *Cerebrovasc Dis* 18: 260-267, 2004.
- Berman RF, Goldman H and Altman HJ.** Age-related changes in regional cerebral blood flow and behavior in Sprague-Dawley rats. *Neurobiol Aging* 9: 691-696, 1988.
- Biernaskie J and Corbett D.** Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J Neurosci* 21: 5272-5280, 2001.
- Biernaskie J, Szymanska A, Windle V and Corbett D.** Bi-hemispheric contribution to functional motor recovery of the affected forelimb following focal ischemic brain injury in rats. *Eur J Neurosci* 21: 989-999, 2005.
- Bloom JS and Hynd GW.** The role of the corpus callosum in interhemispheric transfer of information: excitation or inhibition? *Neuropsychol Rev* 15: 59-71, 2005.
- Bovolenta P, Feraud-Espinosa I, Mendez-Otero R and Nieto-Sampedro M.** Neurite outgrowth inhibitor of gliotic brain tissue. Mode of action and cellular localization, studied with specific monoclonal antibodies. *Eur J Neurosci* 9: 977-989, 1997.
- Brooks-Kayal AR, Jin H, Price M and Dichter MA.** Developmental expression of GABA(A) receptor subunit mRNAs in individual hippocampal neurons in vitro and in vivo. *J Neurochem* 70: 1017-1028, 1998.
- Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY, Kelly ME and Coulter DA.** gamma-Aminobutyric acid(A) receptor subunit expression predicts functional changes in hippocampal dentate granule cells during postnatal development. *J Neurochem* 77: 1266-1278, 2001.
- Brown AW, Marlowe KJ and Bjelke B.** Age effect on motor recovery in a post-acute animal stroke model. *Neurobiol Aging* 24: 607-614, 2003.
- Brumberg JC, Pinto DJ and Simons DJ.** Cortical columnar processing in the rat whisker-to-barrel system. *J Neurophysiol* 82: 1808-1817, 1999.
- Buchkremer-Ratzmann I, August M, Hagemann G and Witte OW.** Electrophysiological transcortical diaschisis after cortical photothrombosis in rat brain. *Stroke* 27: 1105-1109; discussion 1109-1111, 1996.
- Buchkremer-Ratzmann I and Witte OW.** Extended brain disinhibition following small photothrombotic lesions in rat frontal cortex. *Neuroreport* 8: 519-522, 1997.

- Buonomano DV and Merzenich MM.** Associative synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons is not sensitive to unpaired presynaptic activity. *J Neurophysiol* 76: 631-636, 1996.
- Bury SD, Adkins DL, Ishida JT, Kotzer CM, Eichhorn AC and Jones TA.** Denervation facilitates neuronal growth in the motor cortex of rats in the presence of behavioral demand. *Neurosci Lett* 287: 85-88, 2000.
- Butefisch CM, Netz J, Wessling M, Seitz RJ and Homberg V.** Remote changes in cortical excitability after stroke. *Brain* 126: 470-481, 2003.
- Butefisch CM, Khurana V, Kopylev L and Cohen LG.** Enhancing encoding of a motor memory in the primary motor cortex by cortical stimulation. *J Neurophysiol* 91: 2110-2116, 2004.
- Calautti C and Baron JC.** Functional neuroimaging studies of motor recovery after stroke in adults: a review. *Stroke* 34: 1553-1566, 2003.
- Castro-Alamancos MA and Borrel J.** Functional recovery of forelimb response capacity after forelimb primary motor cortex damage in the rat is due to the reorganization of adjacent areas of cortex. *Neuroscience* 68: 793-805, 1995.
- Castro-Alamancos MA, Donoghue JP and Connors BW.** Different forms of synaptic plasticity in somatosensory and motor areas of the neocortex. *J Neurosci* 15: 5324-5333, 1995.
- Chapman PF.** Cognitive aging: recapturing the excitation of youth? *Curr Biol* 15: R31-33, 2005.
- Chen ZL and Strickland S.** Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 91: 917-925, 1997.
- Choi DW.** Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23: 1261-1276, 1992.
- Churs L, Spengler F, Jürgens M and Dinse HR.** Environmental enrichment counteracts decline of sensorimotor performance and deterioration of cortical organization in aged rats. *22*: 102, 1996.
- Cicinelli P, Pasqualetti P, Zaccagnini M, Traversa R, Oliveri M and Rossini PM.** Interhemispheric asymmetries of motor cortex excitability in the postacute stroke stage: a paired-pulse transcranial magnetic stimulation study. *Stroke* 34: 2653-2658, 2003.
- Clark SA, Allard T, Jenkins WM and Merzenich MM.** Receptive fields in the body-surface map in adult cortex defined by temporally correlated inputs. *Nature* 332: 444-445, 1988.
- Cousin MA, Hurst H and Nicholls DG.** Presynaptic calcium channels and field-evoked transmitter exocytosis from cultured cerebellar granule cells. *Neuroscience* 81: 151-161, 1997.

- Cramer SC and Chopp M.** Recovery recapitulates ontogeny. *Trends Neurosci* 23: 265-271, 2000.
- Cramer SC.** Functional imaging in stroke recovery. *Stroke* 35: 2695-2698, 2004.
- Dahl E.** Microscopic observations on cerebral arteries. In: *The Cerebral Vessels Wall*, pp. 15-21, Cervos-Navarro, J., Betz, E., Matakas, F. and Wullenweber, R. (eds.) Raven Press, New York., 1976.
- Darian-Smith C, Darian-Smith I and Cheema SS.** Thalamic projections to sensorimotor cortex in the newborn macaque. *J Comp Neurol* 299: 47-63, 1990.
- Deshmukh DR and Patel MS.** Age-dependent changes in pyruvate uptake by nonsynaptic and synaptic mitochondria from rat brain. *Mech Ageing Dev* 20: 343-351, 1982.
- Dietrich WD, Busto R, Watson BD, Scheinberg P and Ginsberg MD.** Photochemically induced cerebral infarction. II. Edema and blood-brain barrier disruption. *Acta Neuropathol (Berl)* 72: 326-334, 1987a.
- Dietrich WD, Watson BD, Busto R, Ginsberg MD and Bethea JR.** Photochemically induced cerebral infarction. I. Early microvascular alterations. *Acta Neuropathol (Berl)* 72: 315-325, 1987b.
- Dietrich WD, Feng ZC, Leistra H, Watson BD and Rosenthal M.** Photothrombotic infarction triggers multiple episodes of cortical spreading depression in distant brain regions. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 20-28, 1994.
- Dijkhuizen RM, Ren J, Mandeville JB, Wu O, Ozdag FM, Moskowitz MA, Rosen BR and Finklestein SP.** Functional magnetic resonance imaging of reorganization in rat brain after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12766-12771, 2001.
- Dijkhuizen RM, Singhal AB, Mandeville JB, Wu O, Halpern EF, Finklestein SP, Rosen BR and Lo EH.** Correlation between brain reorganization, ischemic damage, and neurologic status after transient focal cerebral ischemia in rats: a functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci* 23: 510-517, 2003.
- Dinse HR.** Treating the aging brain: cortical reorganization and behavior. *Acta Neurochir Suppl* 93: 79-84, 2005.
- Domann R, Hagemann G, Kraemer M, Freund HJ and Witte OW.** Electrophysiological changes in the surrounding brain tissue of photochemically induced cortical infarcts in the rat. *Neurosci Lett* 155: 69-72, 1993.
- Donahue S, Zeman W and Watanabe I.** Alterations of basement membranes of cerebral capillaries. *J Neuropathol Exp Neurol* 26: 397-411, 1967.
- Duan H, Wearne SL, Rocher AB, Macedo A, Morrison JH and Hof PR.** Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb Cortex* 13: 950-961, 2003.

- Dykes RW, Landry P, Metherate R and Hicks TP.** Functional role of GABA in cat primary somatosensory cortex: shaping receptive fields of cortical neurons. *J Neurophysiol* 52: 1066-1093, 1984.
- Edelman GM.** Neural Darwinism: selection and reentrant signaling in higher brain function. *Neuron* 10: 115-125, 1993.
- Elbert T, Flor H, Birbaumer N, Knecht S, Hampson S, Larbig W and Taub E.** Extensive reorganization of the somatosensory cortex in adult humans after nervous system injury. *Neuroreport* 5: 2593-2597, 1994.
- Elbert T, Pantev C, Wienbruch C, Rockstroh B and Taub E.** Increased cortical representation of the fingers of the left hand in string players. *Science* 270: 305-307, 1995.
- Erdo SL and Wolff JR.** Postnatal development of the excitatory amino acid system in visual cortex of the rat. Changes in uptake and levels of aspartate and glutamate. *Int J Dev Neurosci* 8: 205-208, 1990.
- Erecinska M and Silver IA.** Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 43: 37-71, 1994.
- Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA and Anderson CS.** Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol* 2: 43-53, 2003.
- Fieschi C, Argentino C, Lenzi GL, Sacchetti ML, Toni D and Bozzao L.** Clinical and instrumental evaluation of patients with ischemic stroke within the first six hours. *J Neurol Sci* 91: 311-321, 1989.
- Fiore L and Rampello L.** L-acetylcarnitine attenuates the age-dependent decrease of NMDA-sensitive glutamate receptors in rat hippocampus. *Acta Neurol (Napoli)* 11: 346-350, 1989.
- Fridman EA, Hanakawa T, Chung M, Hummel F, Leiguarda RC and Cohen LG.** Reorganization of the human ipsilesional premotor cortex after stroke. *Brain* 127: 747-758, 2004.
- Fritschy JM and Mohler H.** GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* 359: 154-194, 1995.
- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A and Benke D.** Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 390: 194-210, 1998.
- Fritschy JM, Schweizer C, Brunig I and Luscher B.** Pre- and post-synaptic mechanisms regulating the clustering of type A gamma-aminobutyric acid receptors (GABAA receptors). *Biochem Soc Trans* 31: 889-892, 2003.

- Frost SB, Barbay S, Friel KM, Plautz EJ and Nudo RJ.** Reorganization of remote cortical regions after ischemic brain injury: a potential substrate for stroke recovery. *J Neurophysiol* 89: 3205-3214, 2003.
- Furukawa K, Fu W, Li Y, Witke W, Kwiatkowski DJ and Mattson MP.** The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci* 17: 8178-8186, 1997.
- Gandin E, Lion Y and Van de Horst A.** Quantum yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives. *Photochem Photobiol* 37: 271-278, 1983.
- Giannetti S, Gaglini P, Granato A and Di Rocco C.** Organization of callosal connections in rats with experimentally induced microgyria. *Childs Nerv Syst* 15: 444-448; discussion 449-450, 1999.
- Giardino L, Zanni M, Fernandez M, Battaglia A, Pignataro O and Calza L.** Plasticity of GABA(a) system during ageing: focus on vestibular compensation and possible pharmacological intervention. *Brain Res* 929: 76-86, 2002.
- Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E and Offen D.** Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev* 54: 271-284, 2002.
- Gonzales RA, Brown LM, Jones TW, Trent RD, Westbrook SL and Leslie SW.** N-methyl-D-aspartate mediated responses decrease with age in Fischer 344 rat brain. *Neurobiol Aging* 12: 219-225, 1991.
- Guo Y, Kaplan IV, Cooper NG and Mower GD.** Expression of two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD67 and GAD65) during postnatal development of the cat visual cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 103: 127-141, 1997.
- Gur RC, Gur RE, Obrist WD, Skolnick BE and Reivich M.** Age and regional cerebral blood flow at rest and during cognitive activity. *Arch Gen Psychiatry* 44: 617-621, 1987.
- Haas HL, Schaerer B and Vosmansky M.** A simple perfusion chamber for the study of nervous tissue slices in vitro. *J Neurosci Methods* 1: 323-325, 1979.
- Hagemann G, Redecker C, Neumann-Haefelin T, Freund HJ and Witte OW.** Increased long-term potentiation in the surround of experimentally induced focal cortical infarction. *Ann Neurol* 44: 255-258, 1998.
- Hatashita T, Ito M, Miyaoka M and Ishii S.** Chronological alterations of regional cerebral blood flow, glucose utilization, and edema formation after focal ischemia in hypertensive and normotensive rats. Significance of hypertension. *Adv Neurol* 52: 29-37, 1990.
- Hensch TK and Stryker MP.** Columnar architecture sculpted by GABA circuits in developing cat visual cortex. *Science* 303: 1678-1681, 2004.

- Hernandez TD and Schallert T.** Seizures and recovery from experimental brain damage. *Exp Neurol* 102: 318-324, 1988.
- Hess G, Aizenman CD and Donoghue JP.** Conditions for the induction of long-term potentiation in layer II/III horizontal connections of the rat motor cortex. *J Neurophysiol* 75: 1765-1778, 1996.
- Him A, Johnston AR, Yau JL, Seckl J and Dutia MB.** Tonic activity and GABA responsiveness of medial vestibular nucleus neurons in aged rats. *Neuroreport* 12: 3965-3968, 2001.
- Hoane MR, Akstulewicz SL and Toppen J.** Treatment with vitamin B3 improves functional recovery and reduces GFAP expression following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 20: 1189-1199, 2003.
- Hof PR, Duan H, Page TL, Einstein M, Wicinski B, He Y, Erwin JM and Morrison JH.** Age-related changes in GluR2 and NMDAR1 glutamate receptor subunit protein immunoreactivity in corticocortically projecting neurons in macaque and patas monkeys. *Brain Res* 928: 175-186, 2002.
- Horvath S, Prandovszky E, Pankotai E, Kis Z, Farkas T, Boldogkoi Z, Boda K, Janka Z and Toldi J.** Use of a recombinant pseudorabies virus to analyze motor cortical reorganization after unilateral facial denervation. *Cereb Cortex* 15: 378-384, 2005.
- Hossmann KA.** Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36: 557-565, 1994.
- Hossmann KA.** Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8: 195-208, 1996.
- Hossmann KA.** Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res* 39: 106-120, 1998.
- Huttenlocher PR and Dabholkar AS.** Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 387: 167-178, 1997.
- Jacobs KM and Donoghue JP.** Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections. *Science* 251: 944-947, 1991.
- Jenkins WM, Merzenich MM, Ochs MT, Allard T and Guic-Robles E.** Functional reorganization of primary somatosensory cortex in adult owl monkeys after behaviorally controlled tactile stimulation. *J Neurophysiol* 63: 82-104, 1990.
- Johansen-Berg H, Rushworth MF, Bogdanovic MD, Kischka U, Wimalaratna S and Matthews PM.** The role of ipsilateral premotor cortex in hand movement after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14518-14523, 2002.
- Johansson BB and Belichenko PV.** Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 89-96, 2002.

- Jones EG.** GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex* 3: 361-372, 1993.
- Jones TA and Schallert T.** Use-dependent growth of pyramidal neurons after neocortical damage. *J Neurosci* 14: 2140-2152, 1994.
- Kalisch T, Kleibel N, Tegenthoff M and Dinse HR.** Age-related loss of dominant hand superiority in fine motor performance. *Abstract, Neurowissenschaftliche Gesellschaft, Göttingen., 2005.*
- Kapur J, Stringer JL and Lothman EW.** Evidence that repetitive seizures in the hippocampus cause a lasting reduction of GABAergic inhibition. *J Neurophysiol* 61: 417-426, 1989.
- Katsura K, Kristian T and Siesjö BK.** Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 22: 991-996, 1994.
- Kelly KM, Kharlamov A, Hentosz TM, Kharlamova EA, Williamson JM, Bertram EH, 3rd, Kapur J and Armstrong DM.** Photothrombotic brain infarction results in seizure activity in aging Fischer 344 and Sprague Dawley rats. *Epilepsy Res* 47: 189-203, 2001.
- Kesslak JP, Yuan D, Neepser S and Cotman CW.** Vulnerability of the hippocampus to kainate excitotoxicity in the aged, mature and young adult rat. *Neurosci Lett* 188: 117-120, 1995.
- Keyvani K, Bosse F, Reinecke S, Paulus W and Witte OW.** Postlesional transcriptional regulation of metabotropic glutamate receptors: implications for plasticity and excitotoxicity. *Acta Neuropathol (Berl)* 101: 79-84, 2001.
- Kleim JA, Bruneau R, VandenBerg P, MacDonald E, Mulrooney R and Pocock D.** Motor cortex stimulation enhances motor recovery and reduces peri-infarct dysfunction following ischemic insult. *Neurol Res* 25: 789-793, 2003.
- Kolb B, Cote S, Ribeiro-da-Silva A and Cuello AC.** Nerve growth factor treatment prevents dendritic atrophy and promotes recovery of function after cortical injury. *Neuroscience* 76: 1139-1151, 1997.
- Kolb B, Gibb R and Gorny G.** Experience-dependent changes in dendritic arbor and spine density in neocortex vary qualitatively with age and sex. *Neurobiol Learn Mem* 79: 1-10, 2003.
- Komiskey HL, Raemont LM and Mundinger KL.** Aging: modulation of GABAA binding sites by ethanol and diazepam. *Brain Res* 458: 37-44, 1988.
- Kotila M and Waltimo O.** Epilepsy after stroke. *Epilepsia* 33: 495-498, 1992.
- Kozlowski DA, James DC and Schallert T.** Use-dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions. *J Neurosci* 16: 4776-4786, 1996.

- Leenders KL, Perani D, Lammertsma AA, Heather JD, Buckingham P, Healy MJ, Gibbs JM, Wise RJ, Hatazawa J, Herold S and et al.** Cerebral blood flow, blood volume and oxygen utilization. Normal values and effect of age. *Brain* 113 (Pt 1): 27-47, 1990.
- Li RW, Yu W, Christie S, Miralles CP, Bai J, Loturco JJ and De Blas AL.** Disruption of postsynaptic GABA receptor clusters leads to decreased GABAergic innervation of pyramidal neurons. *J Neurochem* 95: 756-770, 2005.
- Liepert J, Hamzei F and Weiller C.** Motor cortex disinhibition of the unaffected hemisphere after acute stroke. *Muscle Nerve* 23: 1761-1763, 2000a.
- Liepert J, Storch P, Fritsch A and Weiller C.** Motor cortex disinhibition in acute stroke. *Clin Neurophysiol* 111: 671-676, 2000b.
- Liepert J and Weiller C.** Recovery and plasticity imaging in stroke patients. In: *Imaging in stroke*, edited by Hennerici M. London: Remedica Publishing Ltd., 2003, p. 173-198.
- Lu XC, Williams AJ, Yao C, Berti R, Hartings JA, Whipple R, Vahey MT, Polavarapu RG, Woller KL, Tortella FC and Dave JR.** Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion. *J Neurosci Res* 77: 843-857, 2004.
- Luebke JI, Chang YM, Moore TL and Rosene DL.** Normal aging results in decreased synaptic excitation and increased synaptic inhibition of layer 2/3 pyramidal cells in the monkey prefrontal cortex. *Neuroscience* 125: 277-288, 2004.
- Luhmann HJ and Prince DA.** Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol* 65: 247-263, 1991.
- Luke LM, Allred RP and Jones TA.** Unilateral ischemic sensorimotor cortical damage induces contralesional synaptogenesis and enhances skilled reaching with the ipsilateral forelimb in adult male rats. *Synapse* 54: 187-199, 2004.
- Manganotti P, Patuzzo S, Cortese F, Palermo A, Smania N and Fiaschi A.** Motor disinhibition in affected and unaffected hemisphere in the early period of recovery after stroke. *Clin Neurophysiol* 113: 936-943, 2002.
- Markus TM, Tsai SY, Bollnow MR, Farrer RG, O'Brien TE, Kindler-Baumann DR, Rausch M, Rudin M, Wiessner C, Mir AK, Schwab ME and Kartje GL.** Recovery and brain reorganization after stroke in adult and aged rats. *Ann Neurol* 58: 950-953, 2005.
- Mehta AK and Ticku MK.** An update on GABA receptors. *Brain Res Brain Res Rev* 29: 196-217, 1999.
- Merzenich MM, Kaas JH, Wall JT, Sur M, Nelson RJ and Felleman DJ.** Progression of change following median nerve section in the cortical representation of the hand in

- areas 3b and 1 in adult owl and squirrel monkeys. *Neuroscience* 10: 639-665, 1983.
- Metherate R and Ashe JH.** Synaptic interactions involving acetylcholine, glutamate, and GABA in rat auditory cortex. *Exp Brain Res* 107: 59-72, 1995.
- Metz GA, Antonow-Schlorke I and Witte OW.** Motor improvements after focal cortical ischemia in adult rats are mediated by compensatory mechanisms. *Behav Brain Res* 162: 71-82, 2005.
- Mohler H, Crestani F and Rudolph U.** GABA(A)-receptor subtypes: a new pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 1: 22-25, 2001.
- Mohler H, Fritschy JM, Crestani F, Hensch T and Rudolph U.** Specific GABA(A) circuits in brain development and therapy. *Biochem Pharmacol* 68: 1685-1690, 2004.
- Morio Y, Takushiji T, Morimoto Y, Fukuda T and Setoguchi M.** Characterization of the transcallosal response in aged rats and its susceptibility to nootropic drugs. *Neuropharmacology* 31: 1067-1072, 1992.
- Morrison JH and Hof PR.** Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278: 412-419, 1997.
- Mullen RJ, Buck CR and Smith AM.** NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116: 201-211, 1992.
- Murase N, Duque J, Mazzocchio R and Cohen LG.** Influence of interhemispheric interactions on motor function in chronic stroke. *Ann Neurol* 55: 400-409, 2004.
- Nedergaard M and Astrup J.** Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [¹⁴C]2-deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab* 6: 607-615, 1986.
- Nedergaard M.** Spreading depression as a contributor to ischemic brain damage. *Adv Neurol* 71: 75-83; discussion 83-74, 1996.
- Needels DL, Nieto-Sampedro M and Cotman CW.** Induction of a neurite-promoting factor in rat brain following injury or deafferentation. *Neuroscience* 18: 517-526, 1986.
- Neumann-Haefelin T, Hagemann G and Witte OW.** Cellular correlates of neuronal hyperexcitability in the vicinity of photochemically induced cortical infarcts in rats in vitro. *Neurosci Lett* 193: 101-104, 1995.
- Neumann-Haefelin T, Staiger JF, Redecker C, Zilles K, Fritschy JM, Mohler H and Witte OW.** Immunohistochemical evidence for dysregulation of the GABAergic system ipsilateral to photochemically induced cortical infarcts in rats. *Neuroscience* 87: 871-879, 1998.

- Neumann-Haefelin T and Witte OW.** Perinfarct and remote excitability changes after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 45-52, 2000.
- Nieto-Sampedro M and Nieto-Diaz M.** Neural plasticity: changes with age. *J Neural Transm* 112: 3-27, 2005.
- Nii Y, Uematsu S, Lesser RP and Gordon B.** Does the central sulcus divide motor and sensory functions? Cortical mapping of human hand areas as revealed by electrical stimulation through subdural grid electrodes. *Neurology* 46: 360-367, 1996.
- Nudo RJ.** Recovery after damage to motor cortical areas. *Curr Opin Neurobiol* 9: 740-747, 1999.
- O'Leary DD, Ruff NL and Dyck RH.** Development, critical period plasticity, and adult reorganizations of mammalian somatosensory systems. *Curr Opin Neurobiol* 4: 535-544, 1994.
- Ossowska K, Wolfarth S, Schulze G, Wardas J, Pietraszek M, Lorenc-Koci E, Smialowska M and Coper H.** Decline in motor functions in aging is related to the loss of NMDA receptors. *Brain Res* 907: 71-83, 2001.
- Paxinos G and Watson C.** *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 1986.
- Penfield W and Rasmussen T.** The cerebral cortex of man: a clinical study of localization of function. *Macmillan, New York*, 1950.
- Pohlmann-Eden B, Hoch DB, Cochius JI and Chiappa KH.** Periodic lateralized epileptiform discharges--a critical review. *J Clin Neurophysiol* 13: 519-530, 1996.
- Pons TP, Garraghty PE, Ommaya AK, Kaas JH, Taub E and Mishkin M.** Massive cortical reorganization after sensory deafferentation in adult macaques. *Science* 252: 1857-1860, 1991.
- Porter JT, Johnson CK and Agmon A.** Diverse types of interneurons generate thalamus-evoked feedforward inhibition in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 21: 2699-2710, 2001.
- Qu M, Buchkremer-Ratzmann I, Schiene K, Schroeter M, Witte OW and Zilles K.** Bihemispheric reduction of GABAA receptor binding following focal cortical photothrombotic lesions in the rat brain. *Brain Res* 813: 374-380, 1998.
- Que M, Witte OW, Neumann-Haefelin T, Schiene K, Schroeter M and Zilles K.** Changes in GABA(A) and GABA(B) receptor binding following cortical photothrombosis: a quantitative receptor autoradiographic study. *Neuroscience* 93: 1233-1240, 1999.
- Ramirez-Lassepas M.** Stroke and the aging of the brain and the arteries. *Geriatrics* 53 Suppl 1: S44-48, 1998.

- Recanzone GH, Merzenich MM, Jenkins WM, Grajski KA and Dinse HR.** Topographic reorganization of the hand representation in cortical area 3b owl monkeys trained in a frequency-discrimination task. *J Neurophysiol* 67: 1031-1056, 1992.
- Redecker C, Luhmann HJ, Hagemann G, Fritschy JM and Witte OW.** Differential downregulation of GABAA receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J Neurosci* 20: 5045-5053, 2000.
- Redecker C, Wang W, Fritschy JM and Witte OW.** 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, 2002.
- Reinecke S, Lutzenburg M, Hagemann G, Bruehl C, Neumann-Haefelin T and Witte OW.** Electrophysiological transcortical diaschisis after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. *Neurosci Lett* 261: 85-88, 1999.
- Reinecke S, Dinse HR, Reinke H and Witte OW.** Induction of bilateral plasticity in sensory cortical maps by small unilateral cortical infarcts in rats. *Eur J Neurosci* 17: 623-627, 2003.
- Reinke H and Dinse HR.** Functional characterization of cutaneous mechanoreceptor properties in aged rats. *Neurosci Lett* 216: 171-174, 1996.
- Richards CD and McIlwain H.** Electrical responses in brain samples. *Nature* 215: 704-707, 1967.
- Riout-Pedotti MS, Friedman D, Hess G and Donoghue JP.** Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat Neurosci* 1: 230-234, 1998.
- Rosen CL, Dinapoli VA, Nagamine T and Crocco T.** Influence of age on stroke outcome following transient focal ischemia. *J Neurosurg* 103: 687-694, 2005.
- Rosenzweig ES and Barnes CA.** Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* 69: 143-179, 2003.
- Rozas C, Frank H, Heynen AJ, Morales B, Bear MF and Kirkwood A.** Developmental inhibitory gate controls the relay of activity to the superficial layers of the visual cortex. *J Neurosci* 21: 6791-6801, 2001.
- Ruano D, Khan Z, De Blas AL, Machado A and Vitorica J.** Molecular heterogeneity of the type I GABAA/benzodiazepine receptor complex. *Eur J Pharmacol* 267: 123-128, 1994.
- Ruano D, Araujo F, Bentareha R and Vitorica J.** Age-related modifications on the GABAA receptor binding properties from Wistar rat prefrontal cortex. *Brain Res* 738: 103-108, 1996.

- Ruano D, Araujo F, Revilla E, Vela J, Bergis O and Vitorica J.** GABAA and alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptors are differentially affected by aging in the rat hippocampus. *J Biol Chem* 275: 19585-19593, 2000.
- Rudolph U, Crestani F and Mohler H.** GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci* 22: 188-194, 2001.
- Rumbach L.** [Seizures and epilepsy after stroke.]. *Epileptic Disord* 6 Suppl 1: 73-76, 2004.
- Sackin H.** Mechanosensitive channels. *Annu Rev Physiol* 57: 333-353, 1995.
- Sandell JH and Peters A.** Effects of age on the glial cells in the rhesus monkey optic nerve. *J Comp Neurol* 445: 13-28, 2002.
- Sawaki L, Yaseen Z, Kopylev L and Cohen LG.** Age-dependent changes in the ability to encode a novel elementary motor memory. *Ann Neurol* 53: 521-524, 2003.
- Schiene K, Bruehl C, Zilles K, Qu M, Hagemann G, Kraemer M and Witte OW.** Neuronal hyperexcitability and reduction of GABAA-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 906-914, 1996.
- Schiene K, Staiger JF, Bruehl C and Witte OW.** Enlargement of cortical vibrissa representation in the surround of an ischemic cortical lesion. *J Neurol Sci* 162: 6-13, 1999.
- Schmidlin E, Wannier T, Bloch J and Rouiller EM.** Progressive plastic changes in the hand representation of the primary motor cortex parallel incomplete recovery from a unilateral section of the corticospinal tract at cervical level in monkeys. *Brain Res* 1017: 172-183, 2004.
- Seitz RJ and Freund HJ.** Plasticity of the human motor cortex. *Adv Neurol* 73: 321-333, 1997.
- Seitz RJ, Butefisch CM, Kleiser R and Homberg V.** Reorganisation of cerebral circuits in human ischemic brain disease. *Restor Neurol Neurosci* 22: 207-229, 2004.
- Shanina EV, Schallert T, Witte OW and Redecker C.** Behavioral recovery from unilateral photothrombotic infarcts of the forelimb sensorimotor cortex in rats: Role of the contralateral cortex. *Neuroscience*, 2006.
- Shapira S, Sapir M, Wengier A, Grauer E and Kadar T.** Aging has a complex effect on a rat model of ischemic stroke. *Brain Res* 925: 148-158, 2002.
- Shimizu T, Hosaki A, Hino T, Sato M, Komori T, Hirai S and Rossini PM.** Motor cortical disinhibition in the unaffected hemisphere after unilateral cortical stroke. *Brain* 125: 1896-1907, 2002.
- Sieghart W.** Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* 47: 181-234, 1995.

- Sigel E, Baur R, Trube G, Mohler H and Malherbe P.** The effect of subunit composition of rat brain GABAA receptors on channel function. *Neuron* 5: 703-711, 1990.
- Siman R and Noszek JC.** Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* 1: 279-287, 1988.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R and Buhl EH.** Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 26: 113-135, 1998.
- Spengler F, Godde B and Dinse HR.** Effects of ageing on topographic organization of somatosensory cortex. *Neuroreport* 6: 469-473, 1995.
- Stein J.** Motor recovery strategies after stroke. *Top Stroke Rehabil* 11: 12-22, 2004.
- Sterr A, Muller MM, Elbert T, Rockstroh B, Pantev C and Taub E.** Changed perceptions in Braille readers. *Nature* 391: 134-135, 1998.
- Stosberg M.** [The efforts for longevity: what maximum lifespan does society bear?]. *Z Gerontol Geriatr* 36: 89, 2003.
- Sutherland GR, Dix GA and Auer RN.** Effect of age in rodent models of focal and forebrain ischemia. *Stroke* 27: 1663-1667; discussion 1668, 1996.
- Tamaru M, Yoneda Y, Ogita K, Shimizu J and Nagata Y.** Age-related decreases of the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res* 542: 83-90, 1991.
- Taub E, Miller NE, Novack TA, Cook EW, 3rd, Fleming WC, Nepomuceno CS, Connell JS and Crago JE.** Technique to improve chronic motor deficit after stroke. *Arch Phys Med Rehabil* 74: 347-354, 1993.
- Teskey GC, Flynn C, Goertzen CD, Monfils MH and Young NA.** Cortical stimulation improves skilled forelimb use following a focal ischemic infarct in the rat. *Neurol Res* 25: 794-800, 2003.
- Tomaselli KJ, Neugebauer KM, Bixby JL, Lilien J and Reichardt LF.** N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. *Neuron* 1: 33-43, 1988.
- Traystman RJ.** Animal models of focal and global cerebral ischemia. *Ilar J* 44: 85-95, 2003.
- Turgeon SM and Albin RL.** GABAB binding sites in early adult and aging rat brain. *Neurobiol Aging* 15: 705-711, 1994.
- Turner L.** Life extension research: health, illness, and death. *Health Care Anal* 12: 117-129, 2004.
- Uy J, Ridding MC, Hillier S, Thompson PD and Miles TS.** Does induction of plastic change in motor cortex improve leg function after stroke? *Neurology* 61: 982-984, 2003.

- van Lookeren Campagne M and Gill R.** Ultrastructural morphological changes are not characteristic of apoptotic cell death following focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuroscience Letters* 213: 111-114, 1996.
- Vaughan DW and Cahill CJ.** Long term effects of callosal lesions in the auditory cortex of rats of different ages. *Neurobiol Aging* 5: 175-182, 1984.
- Vela J, Gutierrez A, Vitorica J and Ruano D.** Rat hippocampal GABAergic molecular markers are differentially affected by ageing. *J Neurochem* 85: 368-377, 2003.
- Wang H, Wang X and Scheich H.** LTD and LTP induced by transcranial magnetic stimulation in auditory cortex. *Neuroreport* 7: 521-525, 1996.
- Wang RY, Wang PS and Yang YR.** Effect of age in rats following middle cerebral artery occlusion. *Gerontology* 49: 27-32, 2003.
- Ward NS, Brown MM, Thompson AJ and Frackowiak RS.** Neural correlates of motor recovery after stroke: a longitudinal fMRI study. *Brain* 126: 2476-2496, 2003a.
- Ward NS, Brown MM, Thompson AJ and Frackowiak RS.** Neural correlates of outcome after stroke: a cross-sectional fMRI study. *Brain* 126: 1430-1448, 2003b.
- Ward NS.** Neural plasticity and recovery of function. *Prog Brain Res* 150: 527-535, 2005a.
- Ward NS.** Plasticity and the functional reorganization of the human brain. *Int J Psychophysiol* 58: 158-161, 2005b.
- Wardas J, Pietraszek M, Schulze G, Ossowska K and Wolfarth S.** Age-related changes in glutamate receptors: an autoradiographic analysis. *Pol J Pharmacol* 49: 401-410, 1997.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS and Ginsberg MD.** Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17: 497-504, 1985.
- Weiler E, Benali A and Eysel UT.** Loss and renewal of neurons within few hours? A potential pitfall of the neuronal marker NeuN. *Abstract, Neurowissenschaftliche Gesellschaft, Göttingen.*, 2005.
- Wenk GL, Walker LC, Price DL and Cork LC.** Loss of NMDA, but not GABA-A, binding in the brains of aged rats and monkeys. *Neurobiol Aging* 12: 93-98, 1991.
- Whishaw IQ and Metz GA.** Absence of impairments or recovery mediated by the uncrossed pyramidal tract in the rat versus enduring deficits produced by the crossed pyramidal tract. *Behav Brain Res* 134: 323-336, 2002.
- Wikinski SI, Acosta GB, Gravielle MC, Bonavita CD, Bisagno V, Fiszer de Plazas S and Rubio MC.** Diazepam fails to potentiate GABA-induced chloride uptake and to produce anxiolytic-like action in aged rats. *Pharmacol Biochem Behav* 68: 721-727, 2001.

- Wong TP, Marchese G, Casu MA, Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC and De Koninck Y.** Loss of presynaptic and postsynaptic structures is accompanied by compensatory increase in action potential-dependent synaptic input to layer V neocortical pyramidal neurons in aged rats. *J Neurosci* 20: 8596-8606, 2000.
- Wree A, Kaefer C, Birgel B, Schleicher A, Horvath E and Zilles K.** Local cerebral glucose utilization in the brain of old, learning impaired rats. *Histochemistry* 95: 591-603, 1991.
- Yamamoto L and Magalong E.** Outcome measures in stroke. *Crit Care Nurs Q* 26: 283-293; quiz 294-285, 2003.
- Yang TT, Gallen C, Schwartz B, Bloom FE, Ramachandran VS and Cobb S.** Sensory maps in the human brain. *Nature* 368: 592-593, 1994.
- Zhang L, Zhang RL, Wang Y, Zhang C, Zhang ZG, Meng H and Chopp M.** Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Stroke* 36: 847-852, 2005a.
- Zhang S, Boyd J, Delaney K and Murphy TH.** Rapid reversible changes in dendritic spine structure in vivo gated by the degree of ischemia. *J Neurosci* 25: 5333-5338, 2005b.

8. DANKSAGUNG

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. O.W. Witte für die Überlassung dieser Arbeit zur weitgehend selbständigen Bearbeitung innerhalb seines Labors, für unzählige anregende Diskussionen sowie für die Begutachtung des Manuskripts.

Besonderer Dank gilt Dr. Claus Bruehl für die Einarbeitung in elektrophysiologische Methoden sowie für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten. Er hat mich für die Forschung auf dem Gebiet der Neurologie motiviert und war einer meiner besten Lehrer.

Ich bedanke mich bei PD Dr. Christoph Redecker für die Einarbeitung in immunhistochemische Techniken sowie für die Anleitung zum wissenschaftlichen Publizieren.

Ich bedanke mich bei Dr. Armelle Divanach für die Einarbeitung in tierexperimentelle Methoden und Operationstechniken.

Ich bedanke mich bei Prof. G. Jirikowski für die Demonstration der Möglichkeiten am Elektronenmikroskop, die Einarbeitung in immunologische Methoden sowie für wertvolle Diskussionen.

Großer Dank gilt den technischen Mitarbeiterinnen des Labors Svetlana Tausch, Ina Ingrisch, Nicole Manthei, Claudia Sommer, Julia Oberland und Jessica Heyder für Ihre stets hilfsbereite Unterstützung.

Allen namentlich nicht genannten Kollegen danke ich für das angenehme Arbeitsklima im Labor, für ihre stetige Hilfsbereitschaft und anregenden Diskussionen und natürlich für die schöne Zeit.

Der liebevollste Dank gilt meiner Freundin Christina. In schweren Zeiten hast Du an mich geglaubt und gabst mir die stärkste Unterstützung.

Der größte Dank gilt meinen Eltern. Ihr habt mir meinen Weg ermöglicht und mich in allem aufopfernd unterstützt. Euch widme ich diese Arbeit.

9. LEBENS LAUF

1. Persönliche Daten

Name: Silvio Schmidt

Geburtsdatum/ -ort: 19.09.1975, Weißwasser

Eltern: Hans-Jürgen Schmidt
Regina Schmidt, geb. Schwerdtner

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig, keine Kinder

2. Schulbildung

1982 – 1990: Pestalozzi-Oberschule, Weißwasser

1990 – 1991: Bruno-Bürgel Oberschule, Weißwasser

1991 – 1994: Landau Gymnasium, Weißwasser

Juni 1994: Abitur

1994 – 1995: Zivildienst, Naturschutzstation Weißwasser

3. Hochschulstudium

1995 – 2001: Studium der Biologie an der FSU Jena

1997 – 2001: Hilfwissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Allgemeine Botanik der FSU Jena

November 2001: Diplom, Biologie (Untersuchungen zur Rolle carotenoidbindender Proteine bei der Akkumulation von Sekundärkarotenoiden in der Grünalge *Haematococcus pluvialis*)

4. Promotion

seit April 2002: Wissenschaftlicher Mitarbeiter der FSU-Jena in der AG „Experimentelle Neurologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. O.W. Witte

10. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen 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. O. W. Witte,
PD Dr. med. C. Redecker, Dr. rer. nat. C. Bruehl,
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, im April 2006

Silvio Schmidt