

QUANTITATIVE UND MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN IM HIPPOCAMPUS
UND BARREL-KORTEX DER RATTE NACH FACIO-FACIALER ANASTOMOSE

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Georg Gohla

geboren am 13.12.1987 in Rudolstadt

Gutachter (akademischer Grad, Vor- und Nachname, sowie Wirkungsort)

1.

2.

3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

A	Fläche
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of Variances (Varianzanalyse)
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bzw.	beziehungsweise
CA1, CA2, CA3	Cornu Ammonis
Cy3	Indocarbocyanin
EC	Entorhinaler Cortex
et al.	et alia
FFA	facio-faciale Anastomose
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
GD	Gyrus dentatus
Ggl.	Ganglion
Gl.	Glandula
gran.	granulare
Iba1	ionisierendes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül-1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ipsi	ipsilateral
KG	Körpergewicht
kontra	kontralateral
LTD	long-term depression (Langzeit-Depression)
M	mol
M./ Mm.	Musculus/ Musculi (Plural)
mol.	moleculare
MW	Mittelwert
N.	Nervus
N	Anzahl
n.	nervi (Genitiv)

Ncl./ Ncll.	Nucleus/ Nuclei (Plural)
NGF	nerve growth factor
n. s.	nicht signifikant
Nv	numerische Dichte
o. g.	oben genannt
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
Pl.	Plexus
PMBSF	posteromedial barrel subfield
POm	posterior medial nucleus (of the thalamus)
PrV	Nucleus principalis nervi trigemini
pyram.	pyramidale
R.	Ramus
radiat.	radiatum
SD	standard deviation (Standardabweichung)
Sham	Kontrollgruppe
sign.	signifikant
Str.	Stratum
Tab.	Tabelle
V	Volumen
VGLUT2	vesikulärer Glutamat-Transporter-2
VPM	Nucleus ventralis posteromedialis
ZNS	Zentrales Nervensystem
zw.	zwischen

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Anatomie des N. facialis.....	3
1.2 Anatomie des N. trigeminus	3
1.3 Läsionen des N. facialis	4
1.4 Management der peripheren Fazialisparese.....	5
1.5 Pathophysiologie der Defektheilung nach peripherer Fazialisläsion	6
1.6 Axonale Reaktion und synaptische Plastizität	8
1.7 Neuronale Plastizität nach Läsion peripherer Nerven.....	9
1.8 Der Hippocampus als Integrationsorgan der neuronalen Plastizität	11
1.9 Der Barrel-Kortex der Ratte	13
2 Ziele der Arbeit und Studiendesign	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Versuchsablauf.....	18
3.2 Operative Prozeduren.....	18
3.3 Strukturelle Analyse von Hippocampus und Barrel-Kortex.....	19
3.3.1 Gewebepräparation	19
3.3.2 Immunhistochemie.....	22
3.3.3 Stereologie.....	24
3.3.3.1 Kortikale Dicke des Barrel-Kortex	26
3.3.3.2 Volumetrische Messungen des Hippocampus.....	28
3.3.3.3 Iba1.....	28
3.3.3.4 S-100.....	29
3.3.3.5 VGLUT2.....	29
3.4 Fotodokumentation	29
3.5 Statistische Auswertung	29

4	Ergebnisse	31
4.1	Hippocampus	31
4.1.1	Volumetrische Messungen	31
4.1.1.1	Gyrus dentatus	31
4.1.1.2	Cornu Ammonis 3.....	32
4.1.1.3	Cornu Ammonis 1.....	34
4.1.2	Mikroglia.....	35
4.2	Histologische Auswertung des Barrel-Kortex	40
4.2.1	Kortikale Dicke des Barrel-Kortex.....	40
4.2.2	Astrozyten.....	43
4.2.3	VGLUT2	44
5	Diskussion	49
5.1	Hypertrophie des Hippocampus	49
5.2	Ausbleibende Mikrogliose im Hippocampus	51
5.3	Deafferenzierung des Barrel-Kortex	52
5.4	Reaktionen der Astrozyten im Barrel-Kortex.....	54
5.5	Synaptische Plastizität	54
6	Schlussfolgerungen.....	58
7	Literatur- und Quellenverzeichnis	59
8	Anhang.....	70
8.1	Abbildungsverzeichnis	70
8.2	Tabellenverzeichnis.....	71
8.3	Danksagung.....	72
8.4	Tabellarischer Lebenslauf	73
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung	74

Zusammenfassung

Periphere Läsionen des N. facialis können zu einer bleibenden Funktionsstörung der mimischen Muskulatur mit einem hohen Leidensdruck für die Betroffenen führen. Zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze und Verbesserung der funktionellen Defizite sind tierexperimentelle Studien notwendig.

Eine mögliche Ursache für das schlechte funktionelle Outcome nach peripherer Läsion des N. facialis könnte laut aktuellen Studien in einer über Monate persistierenden Deafferenzierung des Ncl. n. facialis liegen. Jedoch scheint es ebenfalls Hinweise zu geben, dass auch das afferente trigeminale System eine entscheidende Rolle in der Regeneration des N. facialis spielt. So konnte in nachfolgenden Studien gezeigt werden, dass das funktionelle Outcome bei Ratten nach experimenteller Fazialisläsion von der Intaktheit des trigeminalen Systems abhängt. Beispielsweise konnte die manuelle Stimulation der gelähmten Gesichtsmuskulatur und der Vibrissen als therapeutischer Ansatz etabliert werden.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse war das Ziel dieser Arbeit, durch stereologische Analysen des Barrel-Kortex zwei Monate nach experimenteller Fazialisläsion die Integration des trigeminalen sensorischen Systems bei peripherer Fazialisläsion zu untersuchen.

Basierend auf vorliegenden MRT-Ergebnissen, welche strukturelle Veränderungen (Hypertrophie) im Hippocampus zeigten, wurde zudem auch diese limbische Struktur morphometrisch untersucht.

Hierzu wurden Hirnschnitte von insgesamt 15 Ratten mikroskopisch ausgewertet. Bei acht Tieren wurde der N. facialis komplett durchtrennt und anschließend eine facio-faciale Anastomose (FFA) vorgenommen. Die anderen sieben Tiere wurden als Kontrolltiere scheinoperiert (Sham), d.h. es fand keine Verletzung des N. facialis statt. Zwei Monate post interventionem erfolgte die Perfusion der Ratten und die Entnahme der Cerebra. Durch immunhistochemische Färbungen und volumetrischer Analysen konnten anschließend strukturelle Veränderungen von Hippocampus und Barrel-Kortex untersucht werden. Mit Hilfe fluoreszierender Antikörper gegen ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül-1 (Iba1) konnten Mikrogliazellen im Hippocampus dargestellt werden. Weiterhin wurden im Barrel-Kortex exzitatorische afferente Axonterminalen mit Hilfe von

Antikörper gegen die vesikulären Glutamat-Transporter-2 (VGLUT2) im Barrel-Kortex quantifiziert. Zusätzlich wurden im Barrel-Kortex Astrozyten durch immunhistochemische Antikörper gegen S100-Protein visualisiert. Die Zytoarchitektonik der untersuchten Strukturen wurde mittels fluoreszierender Nissl-Färbung dargestellt.

Die Ergebnisse ergaben zwei Monate nach der Fazialisläsion kongruente Resultate zu vorhergehenden MRT-Untersuchungen, die eine Volumenzunahme im Hippocampus und eine Volumenabnahme im Barrel-Kortex gezeigt haben. In dieser Arbeit konnte im Hippocampus eine signifikante Volumenzunahme um 15 % im kontralateralen Cornu Ammonis 3 ($p = 0,023$) nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte jedoch im Hippocampus keine signifikant veränderte Mikrogliazellzahl ($p = 0,147$) und im Barrel-Kortex keine Veränderung der Astrozytenzahl zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p = 0,087$).

Im Bereich des somatosensorischen Kortex ergaben sich nur im kontralateralen Barrel-Kortex signifikante Verschmälerungen der kortikalen Dicke (-10 %, $p = 0,004$). Dies wird durch die Annahme gestützt, dass an dieser Lokalisation zum einen die Vibrissen topografisch repräsentiert sind und zum anderen, dass in der Lamina IV fast alle Afferenzen aus dem Ncl. ventralis posteromedialis (VPM) des Thalamus terminieren. Damit sind erste Hinweise gegeben, dass nach peripherer Fazialisläsion nicht nur der Ncl. n. facialis einer Deafferenzierung unterliegt, sondern auch der Barrel-Kortex. Diese Annahme wird auch durch die Analyse der exzitatorischen glutamatergen Terminale bestätigt. Es kam in Lamina IV zu einer signifikanten Abnahme der nominellen Anzahl um 17 % ($p < 0,001$) und der numerischen Dichte um 8 % ($p < 0,001$) von VGLUT2⁺ Terminalen.

Morphologische Veränderungen nach einer peripheren Fazialisparese betreffen nicht nur den Ncl. n. facialis und den motorischen Kortex, sondern auch das trigeminale System und das Cornu Ammonis 3 des Hippocampus als Ort des räumlichen Gedächtnisses. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die in dieser Arbeit nachgewiesenen strukturellen Veränderungen im Zusammenhang mit dem ungenügenden funktionellen Outcome nach Fazialisläsionen stehen.

1 Einleitung

1.1 Anatomie des N. facialis

Der N. facialis oder auch N. intermediofacialis ist als zweiter Kiemenbogennerv der siebte Hirnnerv und besteht aus insgesamt 13000 Nervenfasern mit den zwei Anteilen des N. facialis und des N. intermedius (Davis und Telischi 1995). Während der periphere N. facialis rein motorische Funktionen besitzt und mit über 50 % den Großteil der Nervenfasern ausmacht, besitzt der N. intermedius parasymphatische, sensible und sensorische Anteile (Drake et al. 2007). Die aus dem Ncl. n. facialis stammenden motorischen Efferenzen verlaufen als Pl. intraparotideus durch die Gl. parotis und innervieren die mimische Muskulatur, sowie die Mm. stapedius, stylohyoideus und den Venter posterior des M. digastricus (Schünke et al. 2009). In der Medulla oblongata liegt der Ncl. salivatorius superior, welcher sekretorische parasymphatische Fasern an die Gll. lacrimalis, submandibularis, sublingualis, nasales und palatinae abgibt. Speziell viszerosensible Fasern aus dem Ncl. tractus solitarii verlaufen als Chorda tympani und versorgen die Geschmacksknospen der vorderen zwei Drittel der Zunge (Aumüller et al. 2010). Weitere afferente Fasern des N. intermedius verlaufen über das Ggl. geniculi zum Ncl. spinalis n. trigemini und sind für die Weiterleitung sensibler Informationen von Trommelfell, äußeren Gehörgang und dem retroaurikulären Hautdermatom verantwortlich (Iwata et al. 1972, Rauber et al. 1988).

1.2 Anatomie des N. trigeminus

Der N. trigeminus ist der fünfte Hirnnerv und wird embryologisch dem 1. Branchialbogen zugeordnet (Brodal 1981). Er führt überwiegend somatoafferente Fasern in der Radix sensoria (Portio major) und geringe Anteile speziell viszeroafferente Fasern in der Radix motoria (Portio minor) aus dem Ncl. motorius nervi trigemini (Carpenter 1983). Afferente sensorische Informationen stammen u.a. von den Schnurhaaren, Gesichtshaut, sowie Schleimhäuten von Mund und Nase (Schiebler und Korf 2007, Bale et al. 2013). Motorische trigeminale Efferenzen innervieren die Kau- und Mundbodenmuskulatur, M. tensor tympanii und M. tensor veli palatini (Schünke et al. 2009).

Die Somata der sensorischen Afferenzen befinden sich im bilateralen Ggl. trigeminale. Pseudounipolare Somata von propriozeptiven Fasern sind im Ncl. trigeminalis mesencephalis lokalisiert (Schünke et al. 2009). Sensorische Informationen aus den Schnurrhaaren durchlaufen zwei synaptische Verschaltungen bevor sie im somatosensorischen Kortex verarbeitet werden. Die erste Verschaltung findet im spinalen Trigeminskern Ncl. spinalis nervi trigemini und im Ncl. sensorius principalis statt. Beide Kerne befinden sich im Stammhirn und die abbildende Topographie bleibt erhalten. Die meisten Neurone zweiter Ordnung projizieren zum kontralateralen Ncl. ventralis posteromedialis im Thalamus (Chiaia et al. 1991). Es gibt jedoch auch Fasern die ungekreuzt zur ipsilateralen Seite ziehen (Barnett et al. 1995). Vom Thalamus aus erfolgt die Weiterleitung der Informationen zum primären sensomotorischen Kortex in die Lamina IV (Pierret et al. 2000). Es existieren Hinweise die zeigen, dass eine trigeminale Stimulation auch den sekundären sensomotorischen Kortex aktiviert und zu einer Stimulation des Inselkortex führt (Chudler et al. 1985, Huttunen et al. 1986, Kettenmann et al. 1996).

1.3 Läsionen des N. facialis

Aufgrund seines langstreckigen Verlaufes durch das Felsenbein ist der N. facialis beim Menschen der am häufigsten traumatisch verletzte Hirnnerv (Lorch und Teach 2010). Die idiopathische Fazialisparese (Bell's palsy) ist die häufigste Hirnnervenläsion. Sie tritt mit zunehmendem Lebensalter bei 7-40 Patienten pro 100 000 Einwohnern pro Jahr auf (Rowlands et al. 2002, De Diego-Sastre et al. 2005). Die Auswirkungen spiegeln sich auf psychologischer und anatomischer Ebene wider (Lorch und Teach 2010). Im Vordergrund steht die Abnahme der Lebensqualität durch ästhetische Beeinträchtigungen und funktionellen Ausfälle im Bereich der Willkürmotorik mit Einschränkung bei Artikulation sowie Essen und Trinken (Guntinas-Lichius et al. 2007).

Für die Therapie und Prognose der traumatischen Nervenschädigung werden diese pathogenetisch nach Neuropraxie, Axonotmesis und Neurotmesis klassifiziert (Seddon 1942). Die Neuropraxie ist die mildeste Form und charakterisiert sich durch die Behinderung der Nervenleitfähigkeit ohne Kontinuitätsverletzung. Eine Kontinuitätsunterbrechung des Axons bei vollständig erhaltenen Hüllstrukturen des Nervs

charakterisiert die Axonotmesis. Der distale Axonstumpf degeneriert nach dem Prinzip der Wallerschen Degeneration. Im proximalen Abschnitt erfolgt die Ausbildung eines Wachstumskegels, welcher entlang der Hüllstrukturen mit einer Geschwindigkeit von 1 mm pro Tag das Zielorgan reinnervieren kann. Beide Formen zeichnen sich durch die Möglichkeit einer Restitutio ad integrum aus. Erfolgt eine komplette Nervendurchtrennung von Axon, Myelinscheide und Perineurium, so wird von einer Neurotmesis gesprochen (Seddon 1942). Um die besten funktionellen Ergebnisse zu erreichen, sollte binnen 30 Tage eine direkte End-zu-End-Nervennaht des durchtrennten Nervs durchgeführt werden (Bascom et al. 2000, Guntinas-Lichius et al. 2006). Der Vorteil dieser Nervenplastik liegt in der Reanimation der natürlichen mimischen Muskulatur (und die damit besten funktionellen Ergebnissen) (Guntinas-Lichius 2007). Ist keine direkte Nervennaht möglich, so stellen autologe Nerveninterponate mittels N. auricularis magnus oder N. suralis für längere Defekte die nächste Therapieoption dar (Reddy et al. 1999, Guntinas-Lichius 2004). Bei intrakranieller oder intratemporaler Schädigung, irreversibel geschädigtem proximalen Nervenstumpf oder liegt die Läsion länger als sechs Monate zurück, dann empfiehlt sich eine Hypoglossus-Fazialis-Jump-Nervenastomose (Stennert 1979, May et al. 1991). Diese erreicht gleichwertige funktionelle Ergebnisse wie die Hypoglossus-Fazialis-Nervennaht bei fehlenden Kau-, Schluck- und Artikulationsstörungen (Manni et al. 2001, Guntinas-Lichius et al. 2006).

1.4 Management der peripheren Fazialisparese

Die häufigste Form der erworbenen Fazialisparese ist mit 60-80 % aller Paresen die idiopathische Fazialisparese (Gilden 2004). Diese meist akut und einseitig auftretende Lähmung heilt in der Regel innerhalb von drei Wochen komplett ab (Peitersen 1982). Als zweithäufigste Ursache mit 20-30 % tritt die Fazialisparese bei Zoster oticus in Erscheinung (Robillard et al. 1986). Neben der viralen Genese ist die bakteriell bedingte Borrelien-assoziierte-Fazialisparese eine weitere Ursache, die vor allem bei Kindern die häufigste Ursache einer Fazialisparese darstellt (Evison et al. 2005). Traumata sind nach den entzündlichen Nervenschädigungen die zweithäufigste Ursache für Fazialisparenen (Coker 1991). Kommt es im Rahmen eines Sturzereignisses zu Felsenbeinfrakturen, so ist meist eine Längsfraktur die Ursache für eine Sofortparese des N. facialis (Darrouzet et al.

2001). Neoplastische Proliferationen können prinzipiell an jedem Ort des langstreckigen Verlaufes den Nerv schädigen und meist mehrere Abschnitte des Gesichtsnervs erfassen. Neurinome stellen die häufigste histopathologische Form dar und können durch Kompression und Druck klinische Symptome hervorrufen (Schröder 1999, Scholz et al. 2007).

Das Ausmaß des klinischen Bildes der peripheren Fazialisparese ist abhängig von Lokalisation und Schweregrad der Läsion (Naumann et al. 1994). Dieser wird zum Beispiel mit Hilfe der House-Brackmann Skala von Grad I bis VI beschrieben (House und Brackmann 1985). Klinische Ausprägungen sind Störungen der mimischen Muskulatur mit einem inkompletten Lidschluss, Funktionsstörung des M. stapedius, Schmeckstörungen und die verminderte Produktion von Tränen- und Speichelflüssigkeit. Diese Lähmungsfolgen führen zu Störungen der Gesichtsmotorik, Trink- und Essproblemen, einer Keratokonjunktivitis mit Xerophthalmie und Ulzera, Dysarthrie, Hyposalivation und Hyperakusis (Rohen und Lütjen-Drecoll 2006).

Die Prognose ist insgesamt gut, jedoch abhängig von Ätiologie und Schwere der Läsion. Inkomplette Paresen haben eine höhere Wahrscheinlichkeit zur Restitutio ad integrum als komplette (Ronthal 2011). Borrelien-assoziierte Fazialispareesen weisen immer eine gute Prognose auf, wohingegen Lähmungen nach Zosterinfektion häufiger zu einer Defektheilung führen (Angerer et al. 1993). Die letzten großen Studien zur Prognose und Remission zeigen eine vollständige Rückbildung nach neun Monaten in 82 bzw. 71 % der Fälle (Sullivan et al. 2007, Engstrom et al. 2008). In 16 % der Fälle findet eine fehlerhafte Reinnervation statt, so dass Residuen mit Synkinesien, autonomen Störungen und Kontrakturen auftreten können (Peitersen 1982).

1.5 Pathophysiologie der Defektheilung nach peripherer Fazialisläsion

Kommt es wie in Kapitel 1.3 beschrieben zu einer Neurotmesis, so finden verschiedene Vorgänge am proximalen und distalen Nervenende statt. Dabei erfolgt die Regeneration von proximal nach distal (Brecknell und Fawcett 1996).

Der distale Axonabschnitt degeneriert nach dem Prinzip der Wallerschen Degeneration innerhalb von ca. 24 Stunden (Coleman et al. 1998). Initiiert wird dieser aktive Prozess

durch einen Kalziumeinstrom in das Axon und Fragmentierung des Axons an der Läsionsstelle durch Ubiquitin- und Calpain-Proteasen (Schlaepfer und Hasler 1979, Zimmerman und Schlaepfer 1984). Die Folgen sind eine Auflösung der axonalen Zytoskelettarchitektur mit Membranzerfall und schließlich dem Abbau des Myelinmantels (Glass et al. 1994). Begleitet von einer Invasion von Makrophagen sorgen diese neben Schwann-Zellen für eine weitere Degeneration des Axons einschließlich Phagozytose (Beuche und Friede 1984). Zytokine wie z.B. Interleukin-1 bewirken in Form eines positiven Feedbacks eine weitere Proliferation der Schwann-Zellen (Ide 1996). Bei Axonotmesis bleibt das Endoneurium erhalten und umhüllt proliferierte, nicht-myelinisierende Schwann-Zellen (Büngner-Bänder), welche essentiell für eine erfolgreiche Regeneration sind (Seckel 1990). Schwann-Zellen innerhalb dieser Büngner-Bänder dienen als Target für aussproßende Axone des proximalen Stumpfes, welche zusätzlich durch freigesetzte neurotrophe Faktoren aus den Schwann-Zellen angezogen, sowie in Wachstumsrichtung und -geschwindigkeit beeinflusst werden. (Lundborg 1987, Lindholm et al. 1988).

Am proximalen Nervenstumpf erfolgt eine retrograde Degeneration bis zum nächsten Ranvierschen-Schnürring (Meier und Sollmann 1977). Die axonale Läsion induziert ein Aussproßen mehrerer kollateraler Axone mit einem spezialisierten Vorderende, dem sogenannten Wachstumskegel (Gordon-Weeks 2009). Dieser hat eine bedeutende Rolle für die erfolgreiche Innervation. Der Wachstumskegel enthält dünne fingerförmige Ausläufer, sogenannte Filopodien. Diese enthalten Aktinfilamente und organisieren sich zu hochdynamischen Struktureinheiten (Lockerbie 1987). Durch ihre Kontraktilität sorgen sie für ein zielstrebiges Wachstum der Nervenfasern, welches durch Interaktion mit wachstumsfördernden Faktoren wie z.B. NGF, BDNF, Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronektin entsteht (Millaruelo et al. 1988, Dent und Gertler 2003, Guntinas-Lichius und Wittekindt 2003).

Das Regenerationspotential ist abhängig von der retrograden Axonreaktion, dem axonalen Sprouting (s. Kapitel 1.6) und nervalen Umgebungsreaktionen (Guntinas-Lichius und Angelov 2008). Das Umgebungsmilieu verändert sich und es wandern Mikroglia und Astroglia in das Kerngebiet des N. facialis ein (Plunet et al. 2002). Das axonale Sprouting stellt eine physiologische Maßnahme des Organismus dar und kennzeichnet das Aussproßen von 25 – 50 Tochteraxonen, die zufällig in periphere Endäste einwachsen

(Guntinas-Lichius und Angelov 2008). Dieses Verhalten hat den Verlust der myotopen Organisation zur Folge und kann zur Innervation eines Axons mehrerer Zielmuskeln führen, welches damit die Ursache für das klinische Bild der Synkinesie ist. Dennoch kann die Reduktion des axonalen Sproutings die Fazialisfunktion bei Ratten nicht signifikant verbessern (Guntinas-Lichius et al. 2000, Guntinas-Lichius et al. 2005). Seit neuesten Studien steht die polyneurale Innervation durch terminales Sprouting im Vordergrund. Nach Durchtrennung oder operativer Rekonstruktion tritt ein Phänomen auf, dass motorische Endplatten von mehreren Axonen angesteuert werden. Eine gezielte aktivierende Therapie der Muskulatur mit z.B. mechanischer Stimulation kann eine Reduktion des terminalen Sproutings und eine Verbesserung der funktionalen Regeneration des N. facialis herbeiführen (Angelov et al. 2007). An den angrenzenden Schwann-Zellen der geschädigten Axone finden nervale Umgebungsreaktionen statt. Die Schwann-Zellen produzieren eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie z.B. Neurotrophine, die für das Überleben, Wachstum und Aussprossen der Axone essentiell sind (Guntinas-Lichius und Wittekindt 2003). Im Gegensatz zur mechanischen Stimulation führt die künstliche Applikation von Neurotrophinen an der Läsionsstelle zu einer Steigerung des axonalen Sproutings (Guntinas-Lichius et al. 2001).

1.6 Axonale Reaktion und synaptische Plastizität

Eine Axotomie des N. facialis führt zu neuronalen und gliösen Reaktionen im Ncl. n. facialis mit Verlust von ca. 80 % der synaptischen Kontakte (Blinzinger und Kreuzberg 1968). Die Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen als begleitende Prozesse neben der Stoffwechsellumstellung im Ncl. n. facialis wird durch eine retrograde Axonreaktion hervorgerufen. Innerhalb der Motoneurone erfolgt ein Wechsel von der physiologischen Neurotransmission auf nervenregeneratorische Biosyntheseschritte (Streit et al. 1998, Plunet et al. 2002). Des Weiteren wird eine rasche Proliferation von Astrozyten und Mikrogliazellen bewirkt, welche sich im Kerngebiet des N. facialis gruppieren und sich zwischen die afferenten synaptischen Terminale drängen. Dieses „synaptische Stripping“ blockiert die Neurotransmission und vermindert exzitatorische als auch inhibitorische Terminale, was zu einer Deafferenzierung der proximalen Dendriten führt (Kettenmann et al. 2013, Raslan et al. 2013).

Neben der beschriebenen Proliferation von Astrozyten im nervalen Gewebe kennzeichnet sich die reaktive Astroglieose zusätzlich durch die vermehrte Bildung astrozytärer Intermediärfilamente (Lazarides 1982, Raivich et al. 1999). Im Bereich des Wundrandes führen die läsionsnahen reaktiven Astrozyten zu einer Glianarbe (Reier und Houle 1988, Guntinas-Lichius et al. 1997). Die daraus folgende Deafferenzierung dient der räumlichen Isolation des Neurons vor übermäßig starker afferenter exzitatorischer Stimulation, um die Regeneration des verletzten Neurons zu unterstützen (Moran und Graeber 2004, Navarro et al. 2007). Das Ziel ist die Förderung des axonalen Wachstums um schlussendlich postregenerationem eine Wiederaufnahme der Neuronenaktivität zu gewährleisten.

Unklar ist weiterhin die Kausalität der Mikrogliafortsätze zwischen den präsynaptischen Elementen und den neuronalen Zellkörpern an der Lösung der synaptischen Verbindungen. Eine Studie an einem Mäusestamm ohne funktionsfähige Makrophagen konnte zeigen, dass trotz fehlender Proliferation der Mikrogliazellen ein „synaptisches Stripping“ nach peripherer Fazialisdurchtrennung erfolgte. Demnach sind aktivierte Mikrogliazellen keine unmittelbare Voraussetzung für den Umbau oder die Loslösung präsynaptischer Kontakte verletzter Neurone im ZNS. Trotzdem erfolgt reaktiv eine Mikroglieose mit rascher Expression verschiedener Proteine. Die entstehende Mikroglieose im Fazialiskerngebiet ist eine Woche nach FFA am stärksten ausgeprägt und bleibt nach zwei Monaten immer noch erhöht (Raslan et al. 2013). Gleichzeitig verschiebt sich das Verhältnis von exzitatorischen zu inhibitorischen Terminalen zu Gunsten der Inhibition (Raslan et al. 2013).

Es ist schlussendlich nicht geklärt, welche Signale degenerierte Synapsen zur Aktivierung der Mikrogliazellen bringen. Vermutlich sind Neurotransmitter und niedrigmolekulare Mediatoren dafür verantwortlich. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend sollen die gliösen Reaktionen in dieser Arbeit in Hippocampus und Barrel-Kortex erfasst werden.

1.7 Neuronale Plastizität nach Läsion peripherer Nerven

Neuronale Plastizität ist die Grundlage für die Dynamik des Gehirns und bildet damit die Grundlage aller Lernprozesse. Der Begriff beschreibt dabei die Eigenschaft einzelner

Synapsen, Nervenzellen und ganzer Hirnareale sich in Abhängigkeit ihrer Aktivierung zu verändern. Es wird zwischen kortikaler und synaptischer Plastizität differenziert.

Kortikale Plastizität bezeichnet sowohl strukturelle als auch funktionelle Veränderungen. Entgegen dem Namen finden die Prozesse in kortikalen und nicht-kortikalen Arealen statt. Im adulten Organismus werden zwei Formen der kortikalen Plastizität unterschieden (Dinse und Merzenich 2002). Zum einen die kortikale Plastizität, welche durch Training und Lernen induziert wird und zu morphologischen oder zellulären Veränderungen führt (Schrott 1997, Jones 2000, Martin und Morris 2001). Und zum anderen die läsionsbedingte Plastizität. Diese fasst die kortikale Reorganisation nach peripherer oder kortikaler Verletzung zur Wiederherstellung des ausgefallenen Bereichs zusammen (Nudo et al. 1996, Eysel und Schweigart 1999).

Die synaptische Plastizität wurde 1949 erstmals von Hebb beschrieben. Die Theorie sagt aus, dass bei synchroner Aktivierung zweier Neurone die synaptische Kopplung zwischen ihnen verstärkt wird (Hebb 1949). Durch sich wiederholende Stimuli kann eine langandauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung induziert werden (Bliss und Lomo 1973). Im Gegenzug dazu wird eine langanhaltende Abschwächung der neuronalen Antwort als Langzeitdepression bezeichnet (LTD). Diese Formen der synaptischen Plastizität dauern wenige Stunden an (Ouyang et al. 1999, Kauderer und Kandel 2000). Für einen längerfristigen Effekt ist der Weg der Proteinsynthese unabdingbar (Barea-Rodriguez et al. 2000).

In Bezug zur peripheren Fazialisparese konnten in der Vergangenheit mehrere Arbeiten nachweisen, dass es zu strukturellen Veränderungen im Ncl. n. facialis kommt: Infolge der traumatischen Läsion konnten diese als Zeichen der ZNS-Plastizität gewertet werden (Hundeshagen et al. 2013, Raslan et al. 2013). Auch wurden in einer weiteren aktuellen Arbeit von M. Werle erstmalig morphologische und synaptische Veränderungen im Trigeminskerngebiet nach peripherer Fazialisläsion nachgewiesen (Werle 2014). Humane Daten konnten nach unilateraler idiopathischer Fazialisläsion mittels fMRT-Untersuchungen eine gestörte neuronale Vernetzung im zugehörigen kortikalen motorischen Bereich feststellen (Klingner et al. 2011, Klingner et al. 2014).

Um die neuronale Plastizität der afferenten Bahnen und Verschaltungen im ZNS nach Deafferenzierung ohne Deafferenzierung besser verstehen zu können, soll in dieser Arbeit der Hippocampus, als Struktur der räumlichen Orientierung im Raum, und der Barrel-

Kortex, als primärer Repräsentationsort, mittels morphologischer und quantitativer Verfahren untersucht werden.

1.8 Der Hippocampus als Integrationsorgan der neuronalen Plastizität

Der Hippocampus ist eines der phylogenetisch ältesten Anteile der Großhirnrinde. Er weist eine charakteristische gefaltete Struktur auf und liegt angrenzend an den lateralen Ventrikel bilateral an der medialen Fläche des Temporallappens (Trepel 2012). Im Gegensatz zum sechsschichtigen Isokortex, besteht der Hippocampus aus einem dreischichtigen Aufbau. Zur hippocampalen Formation gehören insgesamt vier Strukturen: Das Subiculum als Verbindungsschnittstelle vom EC zum Hippocampus, die Hippocampusrinde (Cornu Ammonis) und der Gyrus dentatus. Nach der Nomenklatur von Lorente de Nó (1934) wird die Hippocampusrinde von Nagetieren anhand morphologischer Aspekte in die Segmente CA1, CA2 und CA3 untergliedert (Lorente de Nó 1934). Die CA2-Region ist bei Nagern ein schmales dichtes Band und wird deshalb dem CA1-Sektor zugeordnet. Histologisch gliedert sich das Cornu Ammonis in das Stratum pyramidale, oriens und radiatum. Beim Gyrus dentatus werden ebenfalls drei Schichten unterschieden. Das Stratum granulosum mit dicht gepackten Körnerzellen, das Stratum moleculare und den Hilus, welcher sich durch Mooszellen und verschiedene Interneurontypen charakterisiert.

Der Hippocampus ist über extrinsische Verbindungen mit anderen Hirnarealen und über intrinsische Verbindungen innerhalb der hippocampalen Strukturen miteinander synaptisch verknüpft. Der Tractus perforans stellt die maßgebliche Hauptafferenz des Hippocampus dar. Seine kortikalen glutamatergen exzitatorischen Afferenzen entstammen dem entorhinalen Kortex und projizieren durch das Subiculum in die äußere Molekularschicht des Gyrus dentatus (Raisman et al. 1966). In der inneren Molekularschicht terminieren Afferenzen über Kommissuren- und Assoziationsfasern und dem kontra- und ipsilateralen Hippocampus (Swanson et al. 1981). Ausgehend von den Neuronen der Körnerzellen des Gyrus dentatus erfolgt eine Verschaltung über den sog. Moosfasertrakt auf die Pyramidenzellen der CA3-Region. Efferente Fasern verlassen über die Axone der Pyramidenzellen die Hippocampusrinde. Ein Teil der Fasern geben jedoch

rekurrente Kollateralen (Schaffer-Kollateralen) zu den Pyramidenzellen aus der CA1-Region ab. Jede CA3 Pyramidenzelle verschaltet zu ca. 30.000 – 60.000 Neuronen im ipsilateralen Hippocampus (Li et al. 1994).

Aus dem Verlauf dieser Erregungsausbreitung im Hippocampus ergibt sich eine trisynaptische Verschaltungskette von dem Gyrus dentatus über den Moosfasertrakt in CA3, welche über die Schaffer-Kollaterale CA1-Pyramidenzellen erregen (Frotscher et al. 1988). Neben diesen unidirektionalen Verbindungen zeichnet sich die CA3-Region durch ein autoassoziatives Netzwerk mit einer Vielzahl von rekurrenten Verbindungen zwischen einzelnen CA3-Pyramidenzellen aus. Beide Hippocampi sind über die Commissura hippocampi miteinander verknüpft (Kesner 2007).

Der Hippocampus ist eine zentrale Schaltstelle im limbischen System und erhält zumeist hochgradig vorverarbeitete Informationen aus allen Sinnesmodalitäten, die nach Verarbeitung zum Kortex zurückgesendet werden. Durch seine Verbindungen zum Hypothalamus, den Septumkernen und dem Gyrus cinguli nimmt er Einfluss auf das endokrine, viszerale und emotionale Geschehen. Weiterhin ist er eine entscheidende Struktur bei Lern- und Gedächtnisprozessen (Squire 1986, Dhikav und Anand 2007). Daher wird der Hippocampus als Integrationsorgan und supramodales Assoziationszentrum angesehen (Falkai et al. 2001). Auf dieser Grundlage dient der Hippocampus als etabliertes Modell zur Erforschung der synaptischen Plastizität (Frotscher et al. 1990). Ein weiterer Forschungsschwerpunkt ergibt sich aus der niedrigen Reizschwelle für Krampfantladung. Daher steht der Hippocampus auch im Fokus der Epilepsieforschung (Margerison und Corsellis 1966, Khodaie et al. 2014).

Neben den o.g. klassischen Aufgaben des Hippocampus interessiert in dieser Arbeit neben der synaptischen Plastizität die funktionale Spezialisierung innerhalb des Hippocampus. So wird eine unterschiedliche Rolle der anterioren und posterioren Anteile diskutiert (Lepage et al. 1998). Tierexperimentelle Studien an Nagetieren mit hippocampalen Läsionen zeigten eine weitere bedeutende Rolle der mittleren bis posterioren hippocampalen Abschnitte für räumliche Lern- und Gedächtnisprozesse auf (Moser und Moser 1998). Den Grundstein dafür legten O'Keefe und Nadel 1978 mit ihrer aufgestellten Theorie „The hippocampus as a cognitive map“. Demnach speichert der Hippocampus Positionsdaten von Objekten aus der Umgebung in der sich das Individuum aufhält in einer Art inneren kognitiven Karte. Demzufolge ist die primäre Aufgabe des

Hippocampus die Konstruktion und Speicherung dieser kognitiven Karte (O'Keefe und Nadel 1978). Zu dieser Erkenntnis kamen die Forscher dank elektrophysiologischer Beobachtungen in der Ratte. Pyramidenzellen der CA1 und CA3 Region zeigten eine stark erhöhte Neuronenaktivität, wenn sich die Ratte in einer bestimmten Position ihrer Umgebung aufhält (O'Keefe und Dostrovsky 1971, Fox und Ranck 1975). Genau diese erstmalig identifizierten speziellen Pyramidenzellen, die auch als Ortszellen („place cells“) bezeichnet werden, sind für die Detektion und permanente Speicherung der räumlichen Information aus der Umgebung verantwortlich.

1979 stellten Olton und Papas die Theorie auf, dass der Hippocampus räumliche und nicht-räumliche Informationen lediglich temporär als Arbeitsgedächtnis speichert (Olton und Papas 1979).

Beide Modelle haben eine große Bedeutung bei der Verhaltensforschung und Erforschung von Lern- und Gedächtnisprozessen (Nadel und MacDonald 1980, Schwegler et al. 1990, Mennenga et al. 2014, Sampedro-Piquero et al. 2014, Wartman et al. 2014).

1.9 Der Barrel-Kortex der Ratte

Alle aus der Umwelt aufgenommenen Informationen durch die Rezeptoren der Sinnesorgane haben entsprechende Repräsentationen in der Großhirnrinde. Der somatosensorische Kortex dient der Verarbeitung somatosensorischer Modalitäten (z.B. Schmerz, Berührung, Temperatur). Die Verarbeitungsprozesse der sensorischen Kortizes erlauben neben der Darstellung der Informationen als Bilder, Geschmäcke, Geräusche etc. auch die Integration in die Planung zukünftiger motorischer Aktionen im Sinne von Lern- und Gedächtnisbildung. Um eine effiziente Verarbeitung zu gewährleisten sind die primären Kortizes aller Spezies (somatosensorisch, auditorischer und visueller Kortex) in topographischer Anordnung repräsentiert (Welker 1971, Kaas 1997, Diamond et al. 1999). Der primäre somatosensorische Kortex (SI) fungiert als direkter Empfänger der sensorischen Informationen aus dem Thalamus und ist bei Menschen im Gyrus postcentralis des Neokortex lokalisiert. Der sekundäre somatosensorische Kortex (SII) befindet sich posteriolateral im Sulcus lateralis. Nachfolgend geschaltete Kortexareale höherer Ordnung verbinden bereits sensorische und motorische Informationen untereinander. Diese erstrecken sich über den Lobus parietalis posterior.

Die strukturelle Organisation erfolgt in allen Kortexen in vergleichbarem Muster. Dieses gliedert sich in eine laminäre und kolumnäre Organisation. Dem laminären geschichteten Aufbau liegen Unterschiede in der Zusammensetzung und Dichte der Zellen, sowie Form und Größe ihrer Somata zugrunde (Shepherd 2003). Insgesamt unterteilt sich der Kortex zwischen Pia mater und Substantia alba in sechs Laminae (Brodmann 1909). Die Lamina granularis interna (Lamina IV) enthält zum Großteil Sternzellen, welche die Afferenzen von sensorischen thalamischen Neuronen erhalten. Dementsprechend ist die Lamina IV deutlich in sensorischen Arealen wie dem Barrel-Kortex ausgeprägt und fehlt in motorischen Gebieten. Orthogonal zu dieser laminären Organisation differenziert sich der Kortex funktionell in säulenförmige Kolumnen, welche die sechs Laminae vertikal überlagern (Lorente de Nó 1938). Dementsprechend stellt eine Kolumne die Endstation der reinen Afferenz von Informationen der gleichen Submodalität dar (Mountcastle 1957, Hubel et al. 1977).

Nahezu alle Efferenzen aus dem primären somatosensorischen Kortex projizieren auf andere Kortexareale beider Hemisphären (Killackey 1973). Die gesamte Körperoberfläche repräsentiert sich in topografischer Anordnung im primären somatosensorischen Kortex (Rattunkulus bzw. Homunkulus). Dabei sind die einzelnen Körperregionen entsprechend ihrer Relevanz in unterschiedlich starker Ausprägung repräsentiert. Der größte Anteil des somatosensorischen Kortex bei Ratten repräsentieren die Vibrissen und bilden das primärsensorische Areal der Informationsverarbeitung der taktilen Diskrimination ab. Die ca. 25 flexiblen taktilen Organe bestehen aus den Vibrissen und den damit verknüpften Haarfollikelrezeptoren (Welker 1971). Das Vibrissensystem der Ratte stellt das wichtigste Sinnessystem zur Umweltexploration dar, deswegen unterliegt es der überproportional größten kortikalen Repräsentation (Glassman 1994). Die Vibrissen dienen den Nagetieren als Hauptsinnesorgan, sowohl zur räumlichen Orientierung, als auch zur Identifizierung von Gegenständen und Oberflächen (Vincent 1912, Carvell und Simons 1990, Brecht et al. 1997).

Der Begriff Barrel-Kortex bezeichnet einen spezifischen Abschnitt im somatosensorischen Kortex der Ratte. Die Lamina IV des Barrel-Kortex ist für diesen namensgebend und enthält zylindrisch geformte, fässchenartige, multineuronale Einheiten – sogenannte Barrels (Woolsey und Van der Loos 1970). Eine kortikale Kolumne ist ein vertikaler Bereich, der sich über alle kortikalen Schichten erstreckt. Dieser ist dadurch definiert,

dass alle Neurone innerhalb dieser Kolumne ausschließlich durch eine einzige im somatosensorischen Kortex repräsentierte Sinnesmodalität – in diesem Fall also die Vibrissenbewegung und die Tiefensensibilität der Schnauzenregion – erregt werden kann (Mountcastle 1957). Diese Barrels stellen somit topografisch den Repräsentationsort der Vibrissen von Ratten im Neokortex dar. Jeder Barrel ist exakt einer kontralateralen Vibrisse zugeordnet (Welker 1971, Armstrong-James et al. 1992, Jones und Diamond 1995).

Anatomisch gliedert sich der Barrel-Kortex in zwei Subregionen. Das anterolaterale Subareal enthält dichter liegende kleine Barrels, die den Vibrissen der vorderen Schnauzenregion der Ratte entsprechen. Die Barrels des posteromedialen Subareals (PMBSF) sind in fünf Reihen von anterolateral nach posteromedial angeordnet. Sie entsprechen den fünf Reihen der großen Vibrissen am kaudalen Schnauzenbereich der Ratte (Woolsey und Van der Loos 1970). Auf Grund der morphologischen und funktionellen Korrelation zwischen Barrels und Vibrissen stellt das somatosensorische System ein wichtiges Modell zur Untersuchung der synaptischen Plastizität des primär-sensorischen Kortex dar.

Auf zellulärer Ebene wird im Barrel-Kortex, wie in anderen sensorischen Kortexen, zwischen Pyramidenzellen und nicht-pyramidalen Zellen unterschieden. Pyramidenzellen sind glutamaterge und aspartaterge exzitatorische Neurone, welche als Projektionsneurone zu kortikalen und subkortikalen Gebieten projizieren (Dori et al. 1992). In Lamina IV finden sich jedoch hauptsächlich nicht-pyramidale Zellen, die sich als lokal projizierende Interneurone charakterisieren (Kelly und Dodd 1991).

Pro Vibrisse vereinigen sich ca. 70-160 myelinisierte und 20-60 unmyelinisierte Axone zu Nervenfaserbündeln, die sich wiederum zum N. infraorbitalis des N. trigeminus verbinden (Simons 1997). Die pseudounipolaren Somata dieser primären Afferenzen befinden sich im Ggl. trigeminale Gasserii (Dorfl 1985) und ihre Axone terminieren im Ncl. principalis nervi trigemini (PrV) des Trigeminskerngebiets (Hayashi 1980). Die Axone aus den Neuronen dieses Kerngebiets lagern sich zum Lemniscus trigeminalis zusammen und leiten die Informationen zum großen Teil in zwei Kerngebiete des kontralateralen Thalamus weiter. Dies sind zum einen der Ncl. ventralis posteromedialis (VPM) und zum anderen der Ncl. posterior thalami pars medialis (POm) (Smith 1973). Beide thalamischen

Kerne projizieren zu verschiedenen Regionen des Barrel-Kortex, wobei die Fasern des VPM vor allem in der Lamina IV terminieren (Jensen und Killackey 1987, Lu und Lin 1993).

2 Ziele der Arbeit und Studiendesign

Schwerpunkt der aktuellen experimentellen Fazialisforschung ist das Aufzeigen und Erforschen der Ursachen für die unzureichende funktionelle Regeneration nach peripherer Fazialisläsion. Weiterhin sollen neue Therapiekonzepte entwickelt werden, weil aktuelle moderne chirurgische Rekonstruktionsverfahren noch kein zufriedenstellendes funktionelles Ergebnis erbringen.

Bisherige stereologische und quantitative Analysen nach Fazialisläsion beziehen sich am Tiermodell z.B. auf Veränderungen im Ncl. n. facialis (Raslan et al. 2013), Trigeminskern (Werle 2014) und in der kortikalen Plastizität des Motorkortex (Peeva et al. 2006). Bisher existieren jedoch keine Daten über Veränderungen nach erfolgter Deafferenzierung ohne Deafferenzierung im Barrel-Kortex oder Hippocampus. Humane Daten belegen, dass nach peripherer Fazialisläsion eine gestörte neuronale Vernetzung in kortikalen sensomotorischen Integrationsbereichen vorliegt (Klingner et al. 2014). Für die neuronale Vernetzung sind der Barrel-Kortex als sensorischer Repräsentationsort der Vibrissen und der Hippocampus als Lokalisation der räumlichen Orientierung essentiell. Erste vorläufige Ergebnisse magnetresonanztomografischer Messungen von Rattengehirnen zwei Monate nach FFA durch Silvio Schmidt (Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Jena) zeigten strukturelle Veränderungen im ZNS (Zentrales Nervensystem). Erste Befunde wiesen eine Größenzunahme im Hippocampus und eine Größenabnahme im Barrel-Kortex nach (persönliche Mitteilung durch PD Dr. A. Irintchev). Demnach ist ein Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß morphologische Veränderungen in diesen beiden Arealen zwei Monate nach FFA auftreten und ob diese kongruent zu den MRT-Ergebnissen sind. Im zweiten Teil der Arbeit sollte mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen die exzitatorischen glutamatergen Terminale – also die Afferenzen aus dem Thalamus - durch Nachweis der entsprechenden VGLUT2⁺ Synapsen aufgezeigt werden. Um eine mögliche Deafferenzierung kortikaler Strukturen genauer zu beleuchten, wurden weiterhin Astrozyten in ihrer supportiven Aufgabe mittels eines immunhistochemischen Markers (S100) ausgewertet. Da die periphere Fazialisläsion zu einer nachgewiesenen reaktiven Mikrogliose im Ncl. n. facialis führt (Hundeshagen et al. 2013, Raslan et al. 2013), sollte diese These auch im Hippocampus überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsablauf

Es fand eine MRT-Versuchsreihe mit zwei zeitlich versetzten Serien statt. Jede Serie schloss zwölf Tiere ein, wovon jeweils sechs Tiere randomisiert der FFA- und Sham-Gruppe zugeordnet wurden. Die FFA-Gruppe kennzeichnete eine operative Durchtrennung des N. facialis rechts (s. 3.2). Die Sham-Gruppe entsprach der Kontrollgruppe und kennzeichnete sich dadurch, dass ebenfalls ein operativer Eingriff stattfand, jedoch ohne Nervendurchtrennung.

Die Ratten lebten zu fünft in Standardkäfigen. Um Verwechslungen auszuschließen, wurden die Tiere strukturiert nach einem klar definierten System mit gelb leuchtender Pikrinsäure gekennzeichnet. Hiermit wurde die Unverwechselbarkeit jeder Ratte sichergestellt. Die Tiere für diese Arbeit (FFA: N = 8 und Sham: N = 7) wurden nach dem Zufallsprinzip aus der MRT-Gruppe ausgewählt.

Im Alter von zehn Wochen erfolgte die Scheinoperation bzw. die Transsektion des N. facialis rechts mit anschließender künstlicher Anastomose der beiden Nervenstümpfe mittels Nervennaht. Die daraus entstandene Adaptation diente der nachfolgenden nervalen Regeneration. Der linke N. facialis blieb unberührt. Durch die durchgeführten Untersuchungen konnten Einflüsse und Auswirkungen auf die Regeneration analysiert werden.

Im Alter von 18 Wochen wurden die Tiere perfundiert, das Gehirn mit Hirnstamm extrahiert und für die histologischen Untersuchungen postfixiert. Die Versuche wurden durch die Tierschutzkommission des Landes Thüringen geprüft und in Übereinkunft mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt.

3.2 Operative Prozeduren

Die rechtseitige facio-faciale Anastomose wurde durch Prof. Dr. med. O. Guntinas-Lichius und PD Dr. med. A. Irintchev als Operateure durchgeführt. Durch ein standardisiertes OP-Verfahren konnte sichergestellt werden, dass alle Tiere auf die gleiche Art und Weise chirurgisch behandelt wurden (Guntinas-Lichius et al. 2002, Tomov et al. 2002).

Die Anästhesie erfolgte intramuskulär in den rechten M. tibialis anterior mittels einer Dreikomponentenlösung bestehend aus Medetomidin (0,15 mg / kg KG, Domitor-R, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland), Midazolam (2 mg / kg KG, Dormicum-R, Merckle GmbH, Blaubeuren, Deutschland) und Fentanyl (0,005 mg / kg KG, Fentanyl-R Janssen, Janssen, Neuss, Deutschland).

Nach Wirkungseintritt der Analgesie und Sedation wurde die rechte Wangenregion rasiert und die Haut mit einem Skalpell inzidiert. Es folgte die Präparation des Nervenhauptstrangs des N. facialis extratemporal in anatomischer Nähe der Parotis. Mit Hilfe eines Operationsmikroskops zur genaueren Differenzierung wurde der N. facialis 2 mm nach Durchtritt durch das Foramen stylomastoideum distal des Abgangs des N. auricularis posterior lokalisiert und an dieser Stelle durchtrennt. Danach erfolgte die nervale Rekonstruktion des proximalen und distalen Axonstumpfs in Form einer End-zu-End-Anastomose. Zum Einsatz kamen 9-0 Fäden von Ethicon (Norderstedt, Deutschland). Intention war die möglichst atraumatische und gewebeschonende Kontinuitätswiederherstellung. Der Hautschnitt wurde mit drei bis fünf Einzelknopfnähten (Ethicon, 4-0) verschlossen.

Zur Beschleunigung der Aufwachphase erhielten die Ratten unmittelbar postoperativ zur Antagonisierung subkutan die korrespondierenden Antidots aus Antipamezol (0,75 mg / kg KG, Antisedan-R, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland), Flumazenil (0,2 mg / kg KG, Anexate-R, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) und Naloxon (0,12 mg / kg KG, Naloxon, DeltaSelect GmbH, Pfullingen, Deutschland) verabreicht.

3.3 Strukturelle Analyse von Hippocampus und Barrel-Kortex

3.3.1 Gewebepräparation

Um histologische Untersuchungen am sensomotorischen Kortex und Hippocampus vorzunehmen, musste das Gehirn vorher durch Perfusion fixiert werden. Die Tiere erhielten das identische anästhesiologische Verfahren wie zur Operation. Nach Wirkungseintritt erfolgte die abdominelle und thorakale Eröffnung mit anschließender transkardialen Kanülierung. Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Reglo Analog, Ismatec, Zürich, Schweiz) wurde das tierische Gefäßsystem bei Raumtemperatur 15 Minuten mit der Perfusionslösung (Tab. 1) gespült.

Tab. 1 Zusammensetzung verwendeter Pufferlösungen

Lösung	Zusammensetzung
Perfusionslösung	4 % Formaldehyd 0,1 M Kakodylatpuffer pH: 7,3
1 x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
Saccharoselösung	15 % Saccharose in PBS-Puffer gelöst

Nach Eröffnung der Schädelhöhle wurde das Großhirn, Kleinhirn und der Hirnstamm frei präpariert und anschließend für 24 Stunden bei 4 °C in Perfusionslösung fixiert. Zur Kryoprotektion wurde das Gewebe anschließend für drei Tage bei ebenfalls 4 °C Saccharoselösung (Tab. 1) gelagert und dann mittels 2-Methylbutan bei -80 °C zwei Minuten eingefroren. Im Anschluss erfolgte die Lagerung in Szintillationsmessflaschen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in der Stickstofftonne bei -170 °C.

Mittels Kryostat (CM3050, Leica, Nussloch, Deutschland) wurden 40 µm dicke, von rostral nach kaudal ausgehende Transversalschnitte des Gehirns angefertigt. Diese Schnittdicke war notwendig, um einen ausreichend großen dreidimensionalen Raum für die Analyse mittels Disektor-Methode (s. Kapitel 3.3.3) zur Verfügung zu haben. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Superfrost Plus, Menzel, Braunschweig, Deutschland) in einer festgelegten Reihenfolge platziert und bei -20 °C gelagert. Die Anordnung der Schnitte erfolgte dabei nach einem standardisierten Muster (Abb. 1). Hierbei wurden die Schnitte fortlaufend auf zehn Objektträgern aufgetragen. Ist der zehnte erreicht, so wird in einer neuen Zeile auf Objektträger 1 fortgefahren. Das erfolgte bis das Fassungsvermögen der zehn Objektträger aufgebraucht war. Auf Grund der Schnittdicke von 40 µm sind zwei benachbarte Schnitte auf einem Objektträger zehn Schichten und somit 400 µm voneinander entfernt. Dadurch konnte ein Gesamtabbild des Gehirns auf einem

Objektträger sichergestellt werden. In der Praxis wurden vier Schnitte pro Objektträger aufgebracht.

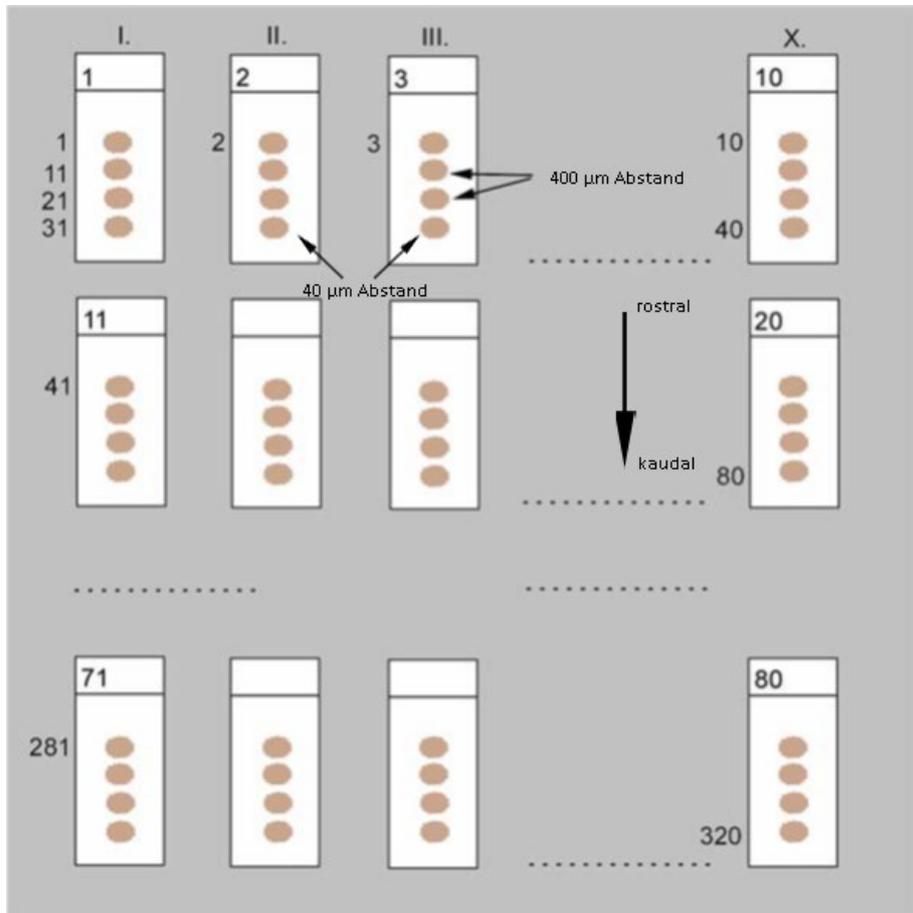


Abb. 1 Anordnung der Gefrierschnitte auf den Objektträgern

Verteilung der koronaren Gefrierschnitte auf den Objektträgern. Während des Schneidevorgangs am Kryostat wurden die Schnitte fortlaufend auf zehn Objektträgern gesammelt, so dass die Präparate nach jedem zehnten Schnitt wieder auf dem ersten Objektträger begonnen wurden aufzubringen bis die Kapazität aller zehn Objektträger erschöpft war. Die folgenden Schnitte wurden analog auf den nächsten zehn Objektträgern gesammelt. Aufgrund der 40 µm dicken Schnitte und der Reihenfolge des Sammelns erfolgte die Darstellung des Großhirns auf jedem Objektträger in 400 µm großen Abständen mit der rostralen Orientierung Richtung beschrifteten Mattrand der Objektträger.

3.3.2 Immunhistochemie

Tab. 2 Darstellung verwendeter Antikörper

Antikörper	Firma	Beschreibung und verwendete Verdünnung
Iba-1 Primärer Antikörper (AK)	Wako Chemicals, Neuss, Deutschland	polyklonale Anti-Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adapter-Molekül-1-Antikörper aus dem Kaninchen; Verdünnung mit Carrageenan: 1:1500
VGLUT2 Primärer AK	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland	polyklonale Anti-Vesikulärer-Glutamat-Transporter-2-Antikörper aus dem Kaninchen Verdünnung mit Carrageenan: 1:1000
S100 Primärer AK	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland	Polyklonale Anti-S100B-Antikörper aus dem Kaninchen; Verdünnung mit Carrageenan: 1:2000
CyTM3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Sekundärer AK	Jackson Immunoresearch, Baltimore, USA	Cy3 (Indocarbocyanin) konjugierte Anti-Kaninchen-Antikörper aus der Ziege Verdünnung mit Carrageenan: 1:200

Tab. 3 Zusammensetzung verwendeter Puffer- und Blockierlösung

Lösung	Zusammensetzung
Carraeenanpuffer	PBS-Puffer lösen mit 0,5% Lambda-Carrageenan 0,02% Natriumazid
Blockierlösung	PBS-Puffer mit: 5 % Normalserum (Ziege) 0,002 % Natriumazid 0,2 % Triton x-100

Das immunhistochemische Verfahren wurde abgewandelt nach Sofroniew und Schrell (Sofroniew und Schrell 1982, Irintchev et al. 2005). Für diese Analyse wurde die indirekte Methode der Immunfluoreszenz verwendet

Abb. 2). Dafür wurde zunächst ein primärer Antikörper (b) auf den Gewebeschnitt gegeben. Dieser reagierte spezifisch mit dem entsprechenden Epitop (a). Im Anschluss daran wurde ein Sekundärantikörper (c), welcher einen Fluoreszenzfarbstoff (d) gebunden hatte, hinzugegeben. Dieser Antikörper band spezifisch den primären Antikörper.

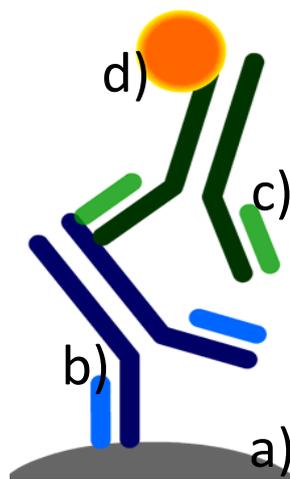


Abb. 2 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz
Schematische Abbildung der indirekten Immunfluoreszenz. Dargestellt sind das Epitop (a), der primäre (b) und sekundäre (c) Antikörper, sowie der Fluoreszenzfarbstoff (d).

Unter einem Fluoreszenz-Mikroskop konnten die an die Gewebeproben gebundenen Antikörper visualisiert werden. Vorteil dieser Methode ist eine höhere Sensitivität und Flexibilität der Nachweismethode (Büttner und Thomas 2003, Hermey et al. 2010). Zusätzlich erfolgte eine Gegenfärbung mittels Nissl-Farbstoff (NeuroTrace^R 500/525 Green Fluorescent Nissl Stain, 1:200, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), um die Erkennung der histologischen Areale zu ermöglichen.

Als ersten Schritt erfolgte die Trocknung der Objektträger für 24 Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank. Anschließend erfolgte die Antigendemaskierung. Diese war notwendig,

um die Immunreaktivität wiederherzustellen, da es bei dem Fixierungsprozess des Gewebes zu Strukturveränderungen der Epitope kommen kann und diese von dem Antikörper nicht mehr erkannt werden (Werner et al. 2000). Dafür wurden die Objektträger in 0,01 M Natriumcitrat-Lösung (pH 9,0) bei 80 °C im Wasserbad für 30 Minuten inkubiert (Jiao et al. 1999). Nach einer kurzen Abkühlungsphase wurden die Objektträger in mit PBS gefüllte Glasküvetten (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Essentiell für Antikörperfärbungen war das Blockieren unspezifischer Antikörperbindungsstellen, um bei der Detektionsfunktion keine weiteren Signale zu erhalten. Das Blockieren dieser unspezifischen Bindungen erfolgte mittels Blockierlösung (s. Tab. 3) bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Objektträger für sechs Tage bei 4 °C mit den in Carrageenan-Puffer gelösten entsprechenden Primärantikörpern. Ungebundene Antikörper wurden mit PBS durch dreimaliges Waschen für 15 Minuten vom Objektträger gespült. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit den rot fluoreszierenden Sekundärantikörpern für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurden die Objektträger erneut dreimal für 15 Minuten mit PBS gewaschen. Für alle Färbereihen wurde eine Gegenfärbung mittels eines grün fluoreszierenden Nissl-Farbstoffes (NeuroTraceR 500/525 Green Fluorescent Nissl Stain, 1:200, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden 200 µl Nisslfarbstoff-Lösung auf die Gehirnschnitte auf dem Objektträger gebracht und dieser 20 Minuten in einer verschlossenen Feuchtekammer inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Objektträger für dreimal 5 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte zum Ausbleichschutz mit einem speziellen Eindeckelmedium (Fluoromount-G, Southern Biotechnology, Eching, Deutschland) abgedeckt und bei 4 °C in einer Kunststoffkiste dunkel im Kühlschrank aufbewahrt.

Für alle Färbereihen wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, bei dem der primäre Antikörper nicht verwendet wurde.

3.3.3 Stereologie

Methode der Wahl zur quantitativen Analyse war die Optical-Disektor-Methode (Howard und Reed 1998). Unter mikroskopischer Sicht erfolgte mit Hilfe des Disektors, einem dreidimensionalen Gerüst, das Zählen von Strukturen innerhalb der Objektpräparate.

Konform zu einem dreidimensionalen Koordinatensystem erstreckte sich der Disektor mit Höhe und Breite entlang der Abszissen- und Ordinatenachse. Die Tiefe dehnte sich senkrecht dazu auf der Applikatenachse aus und entsprach der Präparatdicke von 25 μm . Zusätzlich wurde ein 2 μm großer Sicherheitsabstand zur oberen und unteren Präparatgrenze zum Ausschluss eventuell vorhandener Unebenheiten der Präparatoberflächen festgelegt. In Abhängigkeit von dem zu untersuchenden Antikörperfärbung variierten die geometrischen Parameter des Disektors (Tab. 4).

Die quantitative Analyse von Hippocampus und Barrel-Kortex erfolgte nach klar definierten stereologischen Regeln durch Zählen immunhistochemisch gefärbter Strukturen innerhalb der Disektoren (West 1993). Zellen oder Terminale, die sich innerhalb eines Disektors befanden oder die Akzeptanzlinie berührten (grüne Linie in Abb. 3B), wurden gezählt. Befanden sich Zellen oder Terminale außerhalb des Disektors oder berührten die Verwerfungslinie (rote Linie in Abb. 3B), so wurden diese nicht gezählt. Das Zählen von Synapsen und Zellen erfolgte sowohl auf der ipsi- als auch kontralateralen Seite unter der Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Axioskop 2 mot plus, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit motorisierter 2D-Tischbewegung, Filtersätzen für emittierendes Licht (grün – Filtersatz 10, Emission BP 515-565 und rot – Filtersatz 15, Emission LP 590, Carl-Zeiss, Jena, Deutschland), einer Quecksilber-Kurzbogen- Reflektorlampe (LQ-HXP 120, Carl Zeiss, Jena, Deutschland), einem joystickadaptierten Computersystem (Intel®Core™2 Duo CPU) und der Stereo Investigator 8 Software (MicroBrightField, Williston, Vermont, USA).

Tab. 4 Disektormaße zur stereologischen Analyse

Färbung	x-Achse (μm)	y-Achse (μm)	z-Achse (μm)	Abstand (μm)
Iba1	60	60	10	200
S100	60	60	10	250
VGLUT2	10	10	5	150

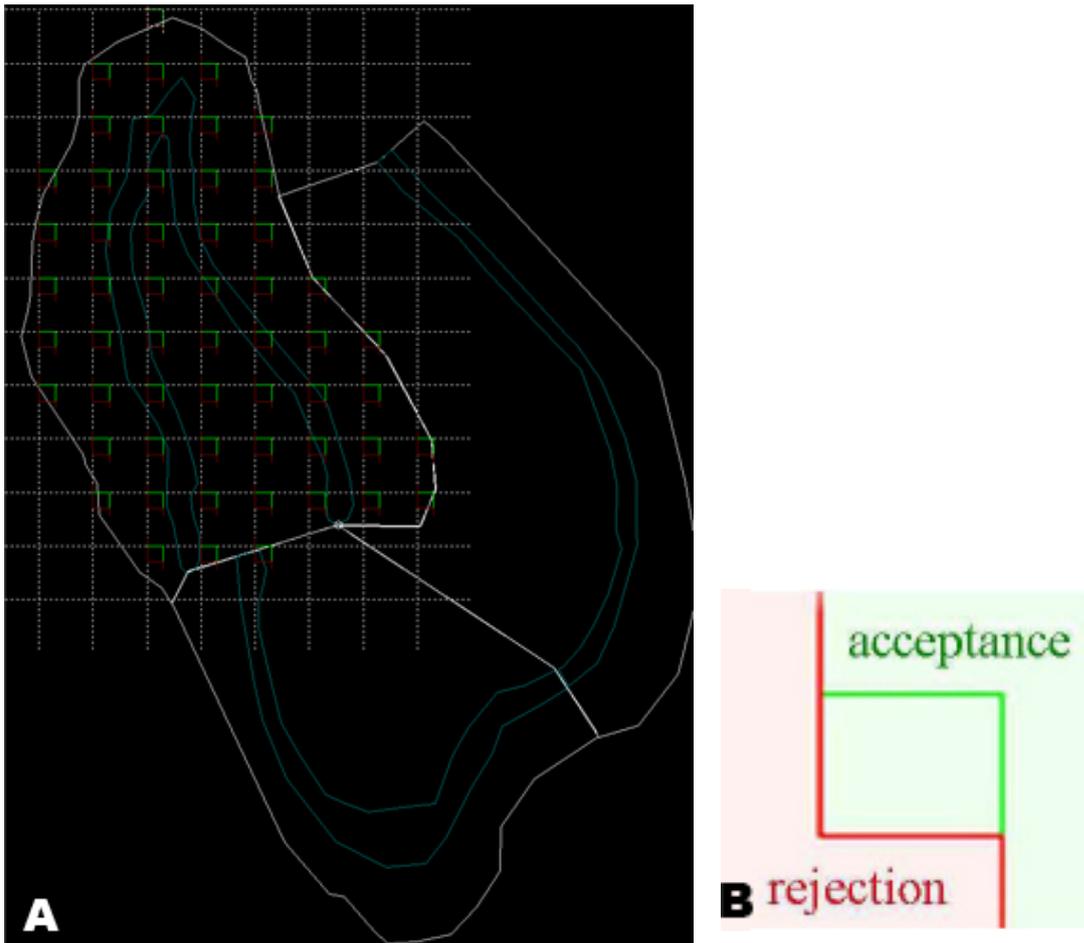


Abb. 3 Stereologische Analyse am Mikroskop

Gezeigt ist der Umriss des dorsalen Hippocampus mit seinen drei Untereinheiten Gyrus dentatus, Cornu Ammonis 3 und Cornu Ammonis 1 in einem histologischen Schnitt (weisse Konturen in Abb. A) mit gleichmäßiger Verteilung von Disektoren. Ein Disektor ist vergrößert in Abb. B dargestellt. Punkte, die die grüne Linie (acceptance line) berührten, mussten mitgezählt werden. Punkte, die an die rote Linie (rejection line) grenzten, wurden beim Zählen ausgeschlossen. Überschneidet eine rote „rejection line“ die weiße Kontur des zu messenden Areals, so wurde der gesamte Disektor aus der Wertung herausgenommen.

3.3.3.1 Kortikale Dicke des Barrel-Kortex

Die kortikale Dicke beschreibt die Dicke des kortikalen Gewebebands, das sich aus den sechs verschiedenen Schichten der grauen Substanz zusammensetzt. Dieses kortikale Band wird nach außen hin durch die Grenze zwischen grauer Substanz und Liquor und nach innen durch den Übergang von grauer zu weißer Substanz begrenzt. Der Barrel-Kortex wurde mit seinen 6 Schichten außen (rote Linie, Abb. 4) und innen (blaue Linie, Abb. 4) bestimmt. Anschließend wurden orthogonal zu den 6 Schichten der Abstand

zwischen der Begrenzung ausgemessen (weiße durchgezogene Linien, Abb. 4, Perimeter 1 und 2).

Zur Berechnung der durchschnittlichen kortikalen Dicke des Barrel-Kortex wurde eine Fläche (A, Flächeninhalt der in Abb. 4 markierten Fläche), die einem bestimmten Abschnitt des Kortex entspricht, in ein Verhältnis gesetzt mit den Orthogonalen zu den 6 Kortexschichten (Perimeter 1 und 2) dieser Fläche (Irintchev et al. 2005). In äquivalenter Vorgehensweise erfolgte die Messung der Schichtdicke der Lamina IV.

$$\text{kortikale Dicke} = \frac{A}{\frac{1}{2} \times (\text{Perimeter 1} + \text{Perimeter 2})}$$

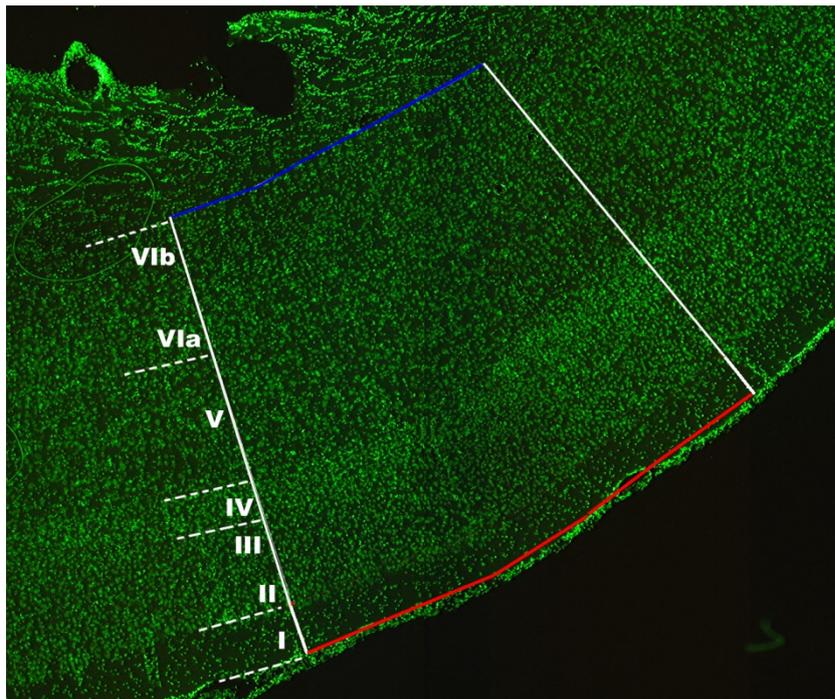


Abb. 4 Darstellung des Barrel-Kortex mittels grün fluoreszierende Nissl-Färbung
 Histologische Darstellung des Barrel-Kortex mit Hilfe grün fluoreszierender Nissl-Färbung in 5x Objektivvergrößerung. Die rote Linie kennzeichnet die äußere und die blaue Linie die innere Begrenzung des Barrel-Kortex. Die beiden durchgehenden weißen Linien liegen orthogonal zu denen einzelnen 6 Schichten und kennzeichnen die kortikale Dicke. Die einzelnen Schichten des Kortex sind in römischen Zahlen dargestellt.

3.3.3.2 Volumetrische Messungen des Hippocampus

Zur Bestimmung des Gesamtvolumens des Hippocampus erfolgte die Anwendung der Cavalieri-Methode (Howard und Reed 1998). Hierbei wurden zunächst die Flächeninhalte der einzelnen Areale stereologisch bestimmt, indem die Arealgrenzen markiert wurden (Abb. 3A und Abb. 5). Das Stratum moleculare bzw. oriens wurde dabei rechnerisch als Subtraktionsgleichung der Gesamtfläche bestimmt. An Hand dieser Einzelflächeninhalte und der Berücksichtigung des Abstands von 400 µm zwischen den Schnitten, konnten die Volumina berechnet werden. Das Produkt ergab sich durch die Summe aller von rostral nach kaudal ermittelten Flächeninhalte (A) und dem Abstand zwischen den Ebenen (h).

$$V = \sum (A) \times h$$

3.3.3.3 Iba1

Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptormolekül-1 (Iba1) ist ein Protein, das in ruhenden Mikrogliazellen exprimiert und in aktivierten Mikrogliazellen hochreguliert wird (Yamada et al. 2006). Neben entzündlichen Prozessen im ZNS führt auch eine periphere Axotomie zur Aktivierung von Mikrogliazellen (Barron et al. 1990, Kreutzberg 1996), da diese das Überleben und die Regeneration der Motoneurone mit beeinflussen (Aldskogius 2011). Nach einer akuten Nervenschädigung formieren sich aktivierte Mikrogliazellen um geschädigte Neurone und Axonterminale, um durch Apoptose entstandene Zelltrümmer zu phagozytieren und den synaptischen Input zu reduzieren (Arvidsson 1979, Jones et al. 1997). Weiterhin lassen aktuelle Studien vermuten, dass Mikrogliazellen auch eine Rolle bei der Ausbildung neuer Synapsen spielen und damit direkt zur ZNS-Plastizität beitragen könnten (Bessis et al. 2007, Raslan et al. 2013).

Zur Quantifizierung der Mikrogliazellen wurden Antikörper gegen Iba1 benutzt (s. Tab. 2). Die Disektorengröße betrug 60 x 60 x 10 µm mit Abständen von 200 µm. Die Zellzählung erfolgte unter 40x Objektivvergrößerung. Zur Verifizierung der gefärbten Strukturen wurde die Nissl-Färbung zum Nachweis vorhandener Kerne in den Mikrogliazellen herangezogen. Somit wurde eine Zelle nur bei vorhandenem Zellkern und unter Einhaltung der stereologischen Kriterien (s. 3.3.3) gezählt (Abb. 9).

3.3.3.4 S-100

S100B ist ebenfalls ein calcium-bindendes Protein und wird in Astrozyten exprimiert. Bei Entzündungsprozessen und Nervenschädigungen unterliegt es einer dynamischen Regulation (Sofroniew 2005). Dies wurde in der Auswertung der Lamina IV des Barrel-Kortex als Marker für eine mögliche Astrozytose genutzt (s. Tab. 2 und Abb. 16). Die Disektorengröße betrug 60 x 60 x 10 µm mit Abständen von 250 µm. Die Zellzählung erfolgte unter 40x Objektivvergrößerung. Zur eindeutigen Identifikation wurde die S100-Färbung wie auch die Iba1-Färbung mit der Nissl-Färbung kombiniert. Nur Zellen mit vorhandenem Zellkern und Erfüllung der stereologischen Kriterien wurden gezählt.

3.3.3.5 VGLUT2

Vesikuläre Glutamat-Transporter (VGLUT) sind in glutamatergen Axonterminalen lokalisiert (Bai et al. 2001). Mittels immunhistochemischer Färbung der VGLUT2 in der Lamina IV des somatosensorischen Kortex konnten afferente Terminale von exzitatorischen Neuronen aus thalamokortikalen Bahnen quantifiziert werden (Graziano et al. 2008). Zur Analyse wurden die Disektoren auf 10 x 10 x 5 µm normiert und der Abstand auf 150 µm festgelegt. Die VGLUT2⁺ Terminale der Lamina IV wurden unter Ölimmersionsmikroskopie in 100x Objektivvergrößerung ausgezählt (Abb. 18).

3.4 Fotodokumentation

Die Aufnahmen der histologischen Schnitte wurden direkt am verwendeten Mikroskop „Axioskop 2“ mittels der Digitalkamera CX9000 (MicroBrightField) durchgeführt. Importiert auf den Arbeitscomputer erfolgte das Speichern und anschließende Bearbeiten in Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, USA).

3.5 Statistische Auswertung

Zum Vergleich zweier Gruppen von Tieren wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) für unabhängige Stichproben mit den Faktoren Behandlung

(Treatment) und Seite (Side) verwendet. Das Signifikanzniveau betrug 5 %. Die Varianzhomogenität wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests vorher geprüft und bestätigt. Bei signifikanten Effekten erfolgte die post-hoc-Analyse der Gruppen mit Hilfe des Holm-Sidak-Tests. Zur Analyse und graphischer Darstellung der Daten wurde die SigmaPlot 12.0 Software (Systat Software, San Jose, CA, USA) verwendet. Die Darstellung der Daten erfolgte anhand von Mittelwerten mit deren Standardabweichungen (SD, Standard Deviation).

4 Ergebnisse

4.1 Hippocampus

4.1.1 Volumetrische Messungen

Ziel der Arbeit war die Quantifizierung der im Vorfeld beschriebenen MRT-Ergebnisse (s. Kapitel 2). Weiterhin diente die volumetrische Bestimmung des Hippocampus als Referenzvolumen, was eine Prämisse für nachfolgende Interpretation der stereologischen Analyse darstellte. Dabei wurde der Hippocampus und seine Subregionen GD, CA3 und CA1 umrandet (Abb. 5) und wie in Kapitel 3.3.3.2 beschrieben das Volumen bestimmt. In gleicher Weise wurde mit Subschichten der drei genannten Regionen verfahren.

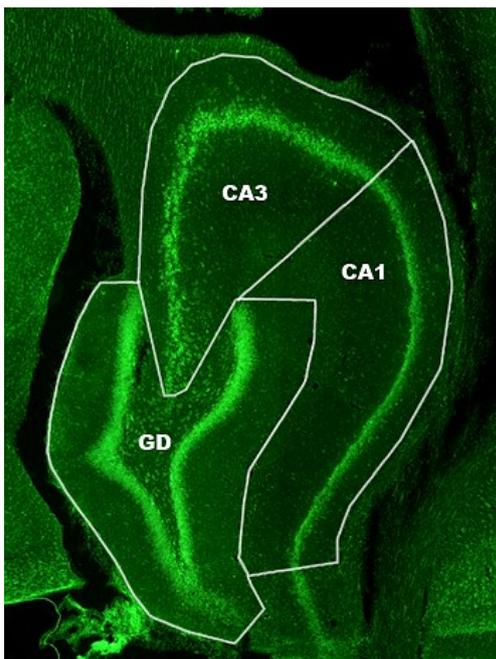


Abb. 5 Volumenbestimmung des Hippocampus
Histologische Darstellung mit Umrandung des Hippocampus und seiner Subregionen Gyrus dentatus (GD), Cornu Ammonis 3 (CA3) und Cornu Ammonis 1 (CA1) mittels grün fluoreszierender Nissl-Färbung in 5x Objektivvergrößerung.

4.1.1.1 Gyrus dentatus

Die volumetrische Analyse des GD aller Hippocampi zeigte keine signifikanten Unterschiede zwei Monate nach FFA im Vergleich zur Kontrollgruppe (FFA: $3,33 \pm 0,36 \text{ mm}^3$ vs. Sham: $3,31 \pm 0,33 \text{ mm}^3$, $p = 0,078$, nach zweifaktorieller Varianzanalyse, Abb. 6). Auch in allen Subregionen waren keine Signifikanzen nachweisbar (Tab. 5).

Tab. 5 Analysis of Variances (ANOVA) des Gyrus dentatus

Dargestellt sind die Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und p-Werte des Gyrus dentatus kontra- und ipsilateral von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8).

	FFA		Sham		p - Wert (ANOVA)
	MW	SD	MW	SD	
Str. granulosum	0,58	0,06	0,58	0,07	p = 0,052
Str. moleculare	1,85	0,17	1,85	0,17	p = 0,061
Hilus	0,90	0,14	0,88	0,11	p = 0,123

Gyrus dentatus

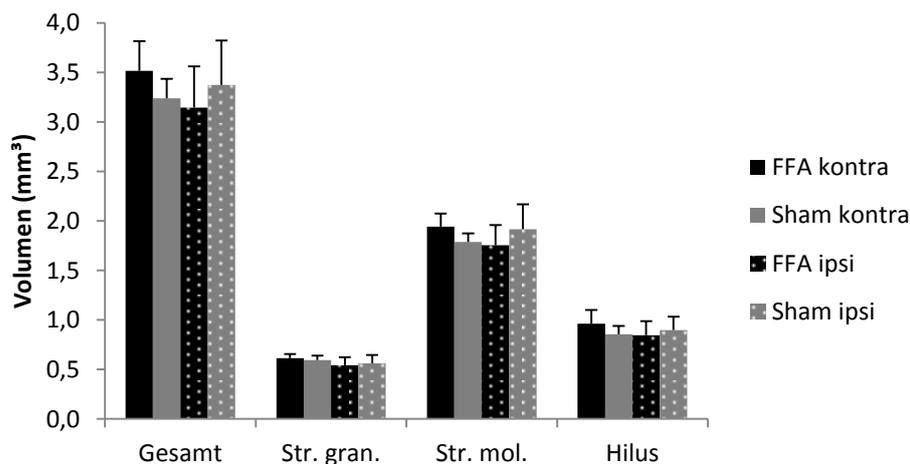


Abb. 6 Volumetrische Analyse des Gyrus dentatus

Dargestellt ist das gesamte Volumen mit den Subregionen Stratum granulosum, Stratum moleculare und Hilus des kontra- und ipsilateralen Gyrus dentatus von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8). Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung (SD). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (p = 0,052, zweifaktorielle Varianzanalyse).

4.1.1.2 Cornu Ammonis 3

Die volumetrischen Untersuchungen des CA3 konnten signifikante Unterschiede in allen Teilbereichen nachweisen (Abb. 7). Die Varianzanalyse zeigte Effekte in der Interaktion

von Kontralateralität und Behandlung (ANOVA Side Treatment Effekt, $p = 0,016$, Abb. 7). Diese Effekte wurden mit dem Holm-Sidak Test für mehrfache Gruppenvergleiche verdeutlicht. Im Gesamtvolumen konnte eine deutliche Zunahme des Volumens um 15 % zwischen FFA kontralateral zu Sham kontralateral (FFA kontra: $2,32 \pm 0,11 \text{ mm}^3$ vs. Sham kontra: $2,02 \pm 0,21 \text{ mm}^3$, $p = 0,023$, Holm-Sidak-Test, Abb. 7) und um 16 % zu FFA ipsilateral (FFA ipsi: $2,00 \pm 0,17 \text{ mm}^3$, $p = 0,010$, Holm-Sidak-Test, Abb. 7) festgestellt werden. Hingegen traten auf der ipsilateralen Seite zwischen FFA und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede auf (Sham ipsi: $2,13 \pm 0,29 \text{ mm}^3$, $p = 0,254$, Holm-Sidak-Test).

Allen Subregionen von CA3 zeigen ähnliche volumetrische Effekte in der Gruppe von FFA kontralateral. Im Stratum pyramidale bestanden ebenfalls signifikante Volumenzunahmen um 12 % zwischen FFA kontralateral und Sham kontralateral (FFA kontra: $0,38 \pm 0,05 \text{ mm}^3$ vs. Sham kontra: $0,34 \pm 0,03 \text{ mm}^3$, $p = 0,044$, Holm-Sidak-Test, Abb. 7), sowie um 27 % zwischen FFA kontralateral und FFA ipsilateral (FFA ipsi: $0,30 \pm 0,01 \text{ mm}^3$, $p < 0,001$, Holm-Sidak-Test, Abb. 7). Im Stratum oriens bestand der volumetrisch signifikant erfassbare Unterschied zwischen FFA kontralateral und Sham kontralateral in einer Zunahme um 19 % (FFA kontra: $0,74 \pm 0,07 \text{ mm}^3$ vs. Sham kontra: $0,62 \pm 0,05 \text{ mm}^3$, $p = 0,024$, Holm-Sidak-Test, Abb. 7). Im Stratum radiatum war ein Effekt der Behandlung zwischen der kontralateralen und ipsilateralen Seite zu verzeichnen, die sich in einer Volumenzunahme von 13 % von FFA kontra darstellte (FFA kontra: $1,19 \pm 0,11 \text{ mm}^3$ vs. FFA ipsi: $1,05 \pm 0,10 \text{ mm}^3$, $p = 0,028$, Holm-Sidak-Test, Abb. 7).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die FFA zu einer Hypertrophie der entsprechenden kontralateralen CA3-Region führte.

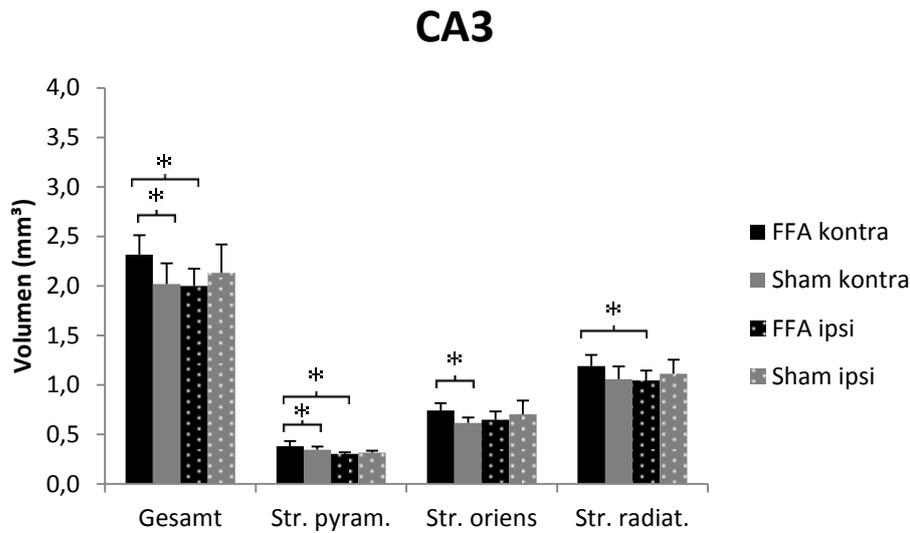


Abb. 7 Volumetrische Analyse des Cornu Ammonis 3

Dargestellt ist das gesamte Volumen mit den Subregionen Stratum pyramidale, Stratum oriens und Stratum radiatum des kontra- und ipsilateralen Cornu Ammonis 3 (CA3) von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8). Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung (SD). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Holm-Sidak-Test nach zweifaktorieller Varianzanalyse).

4.1.1.3 Cornu Ammonis 1

In Abb. 8 werden die Mittelwerte der Volumina der CA1-Region mit Standardabweichungen dargestellt. Auch hier waren wie im Gyrus dentatus (s. Kapitel 4.1.1.1) keine volumetrischen Haupt- oder Interaktionseffekte von Behandlung und Hemisphärenseite zwei Monate nach FFA im Vergleich zur Kontrollgruppe nachzuweisen. (FFA: $3,02 \pm 0,35 \text{ mm}^3$ vs. Sham: $3,03 \pm 0,27 \text{ mm}^3$, $p = 0,452$, nach zweifaktorieller Varianzanalyse, Abb. 8). In den Subregionen des CA1 ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Tab. 6).

Tab. 6 Analysis of Variances (ANOVA) des Cornu Ammonis 1

Dargestellt sind die Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und p-Werte des Cornu Ammonis 1 kontra- und ipsilateral von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8).

	FFA		Sham		p - Wert (ANOVA)
	MW	SD	MW	SD	
Str. pyramidale	0,30	0,03	0,31	0,04	p = 0,098
Str. oriens	0,80	0,10	0,80	0,09	p = 0,519
Str. radiatum	1,93	0,24	1,94	0,18	p = 0,368

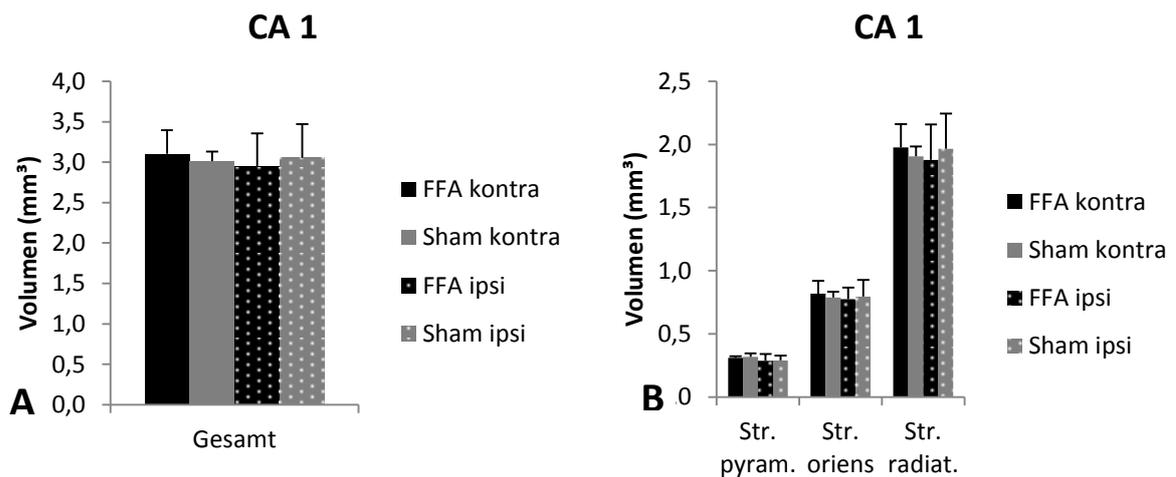


Abb. 8 Volumetrische Analyse des Cornu Ammonis 1

Dargestellt ist das gesamte Volumen (Abb. A) mit den Subregionen Stratum pyramidale, Stratum oriens und Stratum radiatum (Abb. B) des kontra- und ipsilateralen Cornu Ammonis 1 (CA1) von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8). Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung (SD). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p > 0,098$, zweifaktorielle Varianzanalyse).

4.1.2 Mikroglia

Nach einer Neurotmesis kommt es im ZNS zu einer Mikrogliose (Thomas 1992). Diese Mikrogliose kann mittels Iba1-Antikörper immunhistochemisch detektiert werden, da

Iba1-Zellen spezifisch in Mikrogliazellen exprimiert werden (Abb. 9) (Ito et al. 1998, Raslan et al. 2013).

Die mikroskopischen Untersuchungen zwei Monate nach FFA ergaben in der zweifaktoriellen Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede der nominellen Mikrogliaanzahl in beiden Hippocampi im Vergleich zur Kontrollgruppe (FFA: $48,42 \pm 3,88 \times 10^6$ vs. Sham: $46,67 \pm 3,19 \times 10^6$, $p = 0,147$, zweifaktorielle Varianzanalyse, Abb. 10).

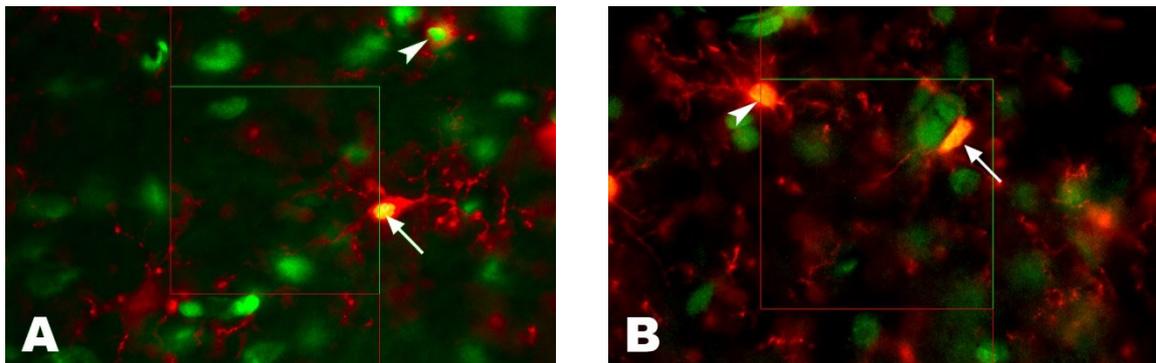


Abb. 9 Darstellung von Mikrogliazellen im Hippocampus

Die Abbildungen zeigen zwei repräsentative Bildausschnitte des Hippocampus in einer Iba1 – Färbung in 40x Objektivvergrößerung. Dargestellt sind Iba⁺ Mikrogliazellen (Pfeile) innerhalb des Hippocampus zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (Abb. A) und Scheinoperation (Abb. B). Die Pfeile stellen Zellen dar, die nach stereologischen Regeln gezählt werden. Die Zelle links in Abb. B (Pfeilspitze) liegt auf der „verbotenen Linie“ und darf nicht gezählt werden.

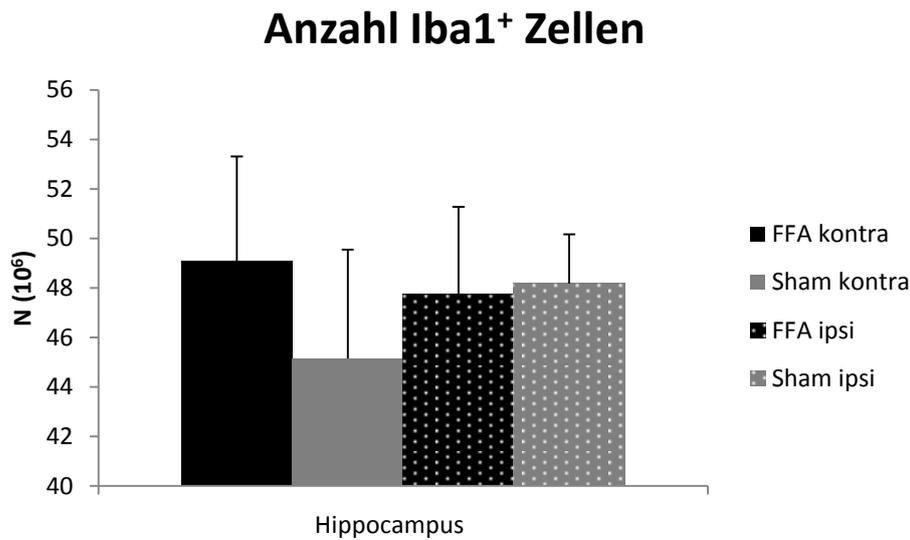


Abb. 10 Quantitative Analyse der Mikrogliazellen des Hippocampus

Die Abbildung zeigt die Anzahl (N) der Iba1⁺ Zellen des kontra- und ipsilateralen Hippocampus von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8). Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung (SD). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,147$, zweifaktorielle Varianzanalyse).

Bei Betrachtung der Subregionen stellten sich jedoch signifikante Unterschiede in Cornu Ammonis 3 dar. Hierbei ergab die zweifaktorielle Varianzanalyse einen signifikanten Haupteffekt der Behandlung und Interaktionseffekt von Hemisphärenseite und Behandlung (ANOVA Treatment Effekt, $p = 0,022$; ANOVA Side Treatment Effekt, $p = 0,016$; Abb. 11).

Bei weiterer Analyse des Haupteffekts ergab sich zum einen, dass die Behandlung auf der ipsilateralen (rechten) Hemisphäre keinen Einfluss auf die Mikrogliaanzahl im Vergleich zur ipsilateralen Seite der Kontrollgruppe hatte (FFA ipsi: $47,77 \pm 3,51 \times 10^6$ vs. Sham ipsi: $48,18 \pm 1,99 \times 10^6$, $p = 0,921$, Holm-Sidak-Test, Abb. 11). Demgegenüber stand die Erhöhung der nominellen Anzahl an Mikrogliazellen um 9 % im kontralateralen Cornu Ammonis 3 zwei Monate nach FFA verglichen zum kontralateralen Cornu Ammonis 3 der Kontrollgruppe (FFA kontra: $49,07 \pm 4,24 \times 10^6$ vs. Sham kontra: $45,15 \pm 4,39 \times 10^6$, $p = 0,002$, Holm-Sidak-Test, Abb. 11).

Nachdem gezeigt wurde, dass die facio-faciale Anastomose einen Einfluss auf Anzahl an Iba1⁺-Zellen hatte, könnten sich die Veränderungen in den Hemisphären unterschiedlich

stark auswirken. Hier konnte jedoch bewiesen werden, dass es innerhalb der FFA-Gruppe keine signifikanten Veränderungen der Mikroglia zwischen ipsilateralen und kontralateralen Cornu Ammonis 3 gibt (FFA kontra: $49,07 \pm 4,24 \times 10^6$ vs. FFA ipsi: $47,77 \pm 3,51 \times 10^6$, $p = 0,061$, Holm-Sidak-Test, Abb. 11).

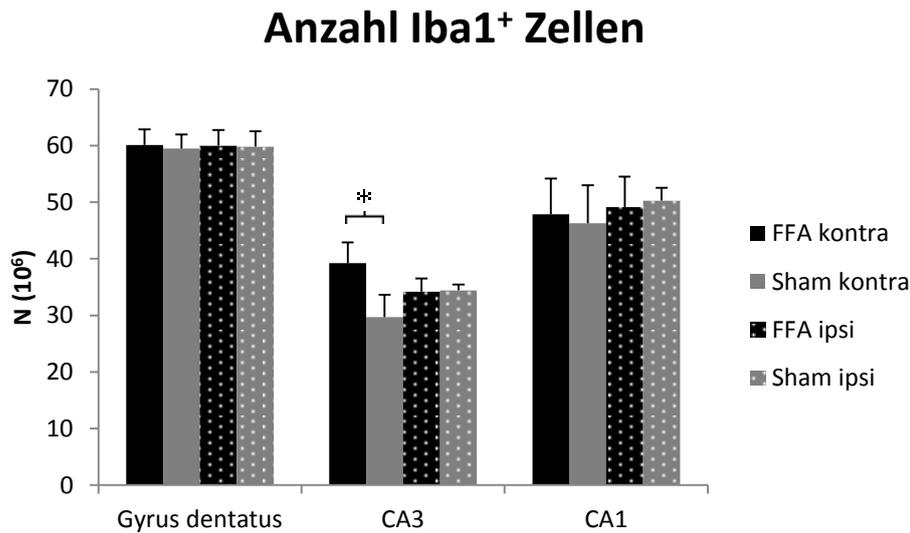


Abb. 11 Quantitative Analyse der Mikrogliazellen der Subregionen des Hippocampus

Die Abbildung zeigt die Anzahl (N) der Iba1⁺ Zellen innerhalb der Subregionen Gyrus dentatus, Cornu Ammonis 3 (CA3) und Cornu Ammonis 1 (CA1) des kontra- und ipsilateralen Hippocampus von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8). Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung (SD). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Holm-Sidak-Test nach zweifaktorieller Varianzanalyse).

Mit Hilfe der ermittelten Anzahl an Mikrogliazellen und den dazugehörigen Referenzvolumina ließ sich die Dichte der Mikrogliazellen pro Kubikmillimeter bestimmen. Dabei ergaben sich in der zweifaktoriellen Varianzanalyse der Mikroglia-dichte des gesamten Hippocampus ein Effekt der Hemisphärenseite (kontralateral: $16,21 \pm 1,30 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. ipsilateral: $17,22 \pm 1,61 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p = 0,035$, zweifaktorielle Varianzanalyse, Abb. 12). Bei Aufschlüsselung der Gruppen nach Behandlung und Kontrollgruppe konnte ermittelt werden, dass dieser Hemisphärenunterschied zwischen kontra- und ipsilateral lediglich innerhalb der FFA-Gruppe bestand (FFA kontra: $16,24 \pm 1,12 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. FFA ipsi: $17,67 \pm 1,51 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p = 0,038$, Holm-Sidak-Test, Abb. 12). Um 8 % nahm die Mikroglia-dichte pro Kubikmillimeter in FFA-kontra im Vergleich zu FFA-

ipsi ab. Wie zu erwarten ergab sich kein signifikanter Effekt innerhalb der Kontrollgruppe (Sham kontra: $16,17 \pm 1,48 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. Sham ipsi: $16,76 \pm 1,71 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p = 0,319$, Holm-Sidak-Test, Abb. 12).

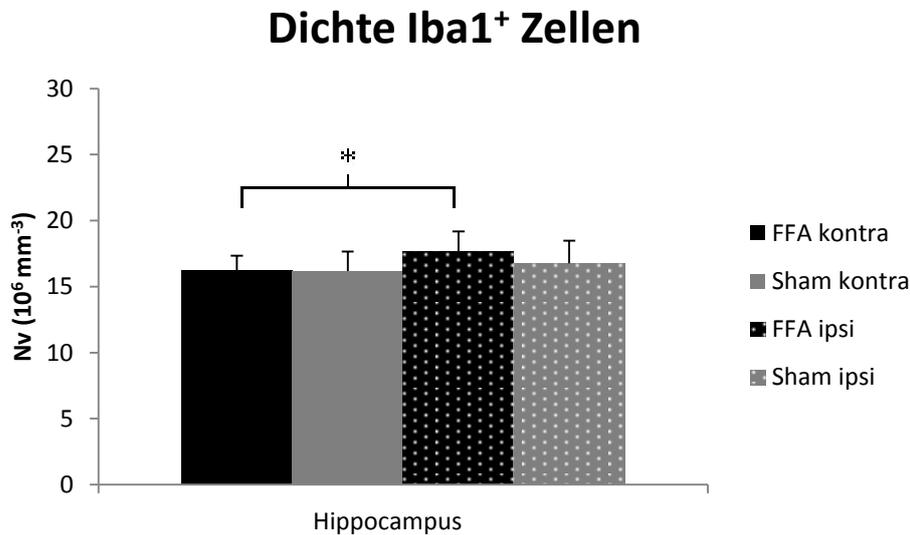


Abb. 12 Quantitative Analyse der Mikroglia-dichte des Hippocampus

Die Abbildung zeigt die numerische Dichte (Nv) der Iba1⁺ Zellen des kontra- und ipsilateralen Hippocampus von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8). Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung (SD). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Holm-Sidak-Test nach zweifaktorieller Varianzanalyse).

Bei der zweifaktoriellen Varianzanalyse der Subregionen des Hippocampus ergaben sich keine signifikanten Effekte der Mikroglia-dichte in Cornu Ammonis 3 ($p = 0,158$).

Bei der Varianzanalyse des Cornu Ammonis 1 stellte sich ein signifikanter Haupteffekt der Hemisphärenseite dar (kontralateral: $15,38 \pm 1,02 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. ipsilateral: $16,61 \pm 1,36 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p = 0,013$, Holm-Sidak-Test, Abb. 13). Die Post-hoc-Analyse ergab, dass die FFA zu einer Minderung der Mikroglia-dichte um 8 % der kontralateralen Hemisphäre im Vergleich zur ipsilateralen Seite führte (FFA kontra: $15,39 \pm 1,00 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. FFA ipsi: $16,72 \pm 1,27 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p = 0,045$, Holm-Sidak-Test, Abb. 13).

Im Gyrus dentatus zeigte sich nach zweifaktorieller Varianzanalyse ein signifikanter Interaktionseffekt von Behandlung und Hemisphärenseite (ANOVA Side Treatment Effekt, $p = 0,042$, Abb. 13). In der Post-hoc-Analyse mittels des Holm-Sidak-Tests konnte kein

signifikanter Effekt zwischen der Gruppe der Ratten mit facio-facialer Anastomose und der Sham-Gruppe festgestellt werden (FFA: $18,22 \pm 1,47 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. Sham: $18,06 \pm 1,94 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p = 0,206$, Holm-Sidak-Test, Abb. 13). Lediglich zwei Monate nach FFA zeigte sich ein signifikanter Effekt innerhalb der FFA-Gruppe zwischen kontralateralen und ipsilateralen Gyrus dentatus, der sich in durch eine Abnahme der Mikroglia-dichte um 11 % charakterisierte (FFA kontra: $17,18 \pm 1,30 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. FFA ipsi: $19,25 \pm 1,64 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p = 0,028$, Holm-Sidak-Test, Abb. 13).

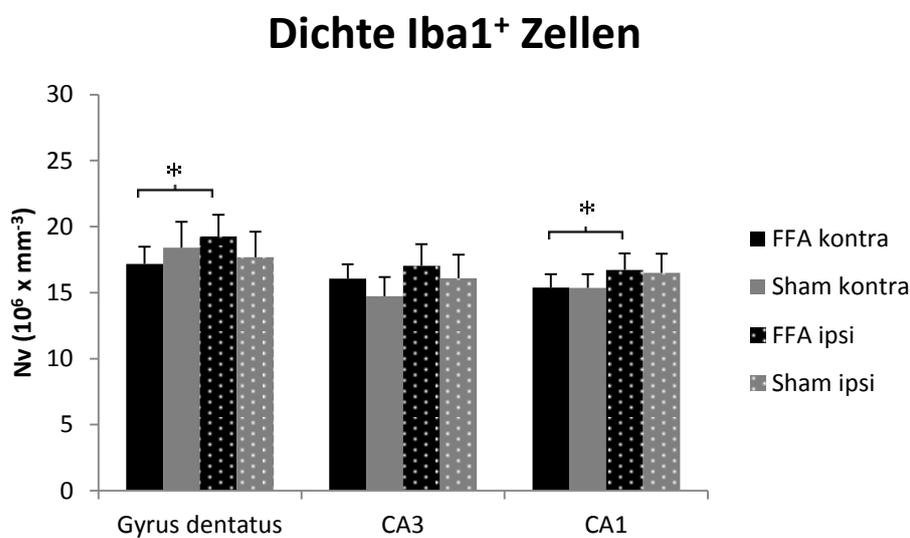


Abb. 13 Quantitative Analyse der Mikroglia-dichte der Subregionen des Hippocampus

Die Abbildung zeigt die numerische Dichte der Iba1⁺ Zellen innerhalb der Subregionen Gyrus dentatus, Cornu Ammonis 3 (CA3) und Cornu Ammonis 1 (CA1) des kontra- und ipsilateralen Hippocampus von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8). Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung (SD). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Holm-Sidak-Test nach zweifaktorieller Varianzanalyse).

4.2 Histologische Auswertung des Barrel-Kortex

4.2.1 Kortikale Dicke des Barrel-Kortex

Der somatosensorische Kortex repräsentiert die somatotopie Anordnung von sensorischen Afferenzen auf die jeweiligen Kortexareale. Die Lamina IV ist ausschließlich in sensorischen Kortex ausgeprägt und stellt das Hauptziel der thalamo-kortikalen Efferenzen dar.

Für die Beurteilung einer Größenveränderung im somatosensorischen Kortex war es notwendig dessen entsprechende Referenzflächen und Durchmesser in beiden Gruppen, sowohl ipsi- als auch kontralateral, zu bestimmen. Die Fläche des Barrel-Kortex wurde in koronaren Schnitten mit Hilfe des Stereo Investigators umrandet und der Durchmesser als kortikale Dicke bestimmt. In der gleichen Weise wurde mit Lamina IV vorgegangen, welche sich durch einen deutlichen Kontrast in der Nissl-Färbung kennzeichnet (Abb. 14).

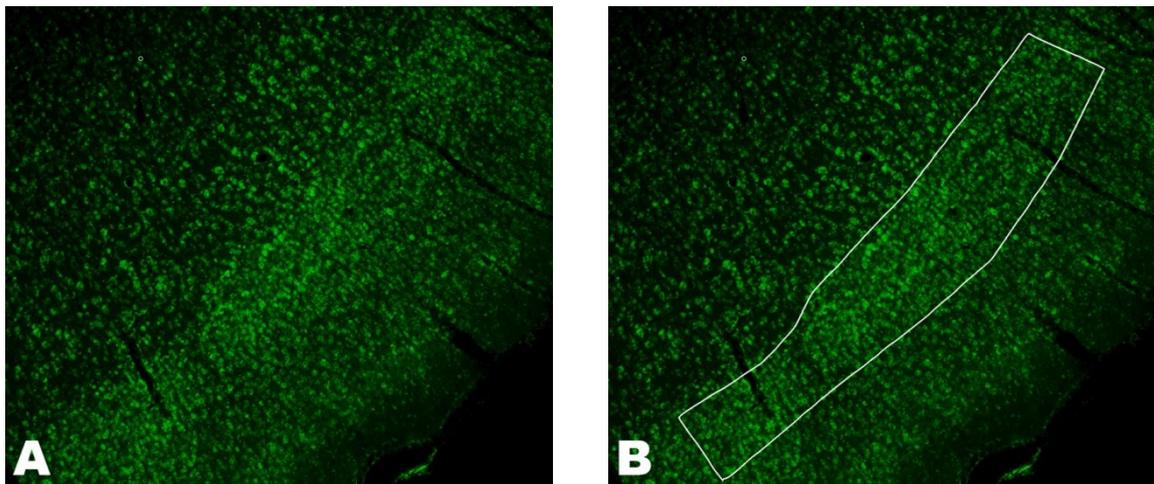


Abb. 14 Fluoreszierende Nissl-Färbung der Lamina IV des Barrel-Kortex

Histologische Darstellung der Lamina IV des somatosensorischen Kortex mittels grün fluoreszierender Nissl-Färbung in 5x Objektivvergrößerung ohne (Abb. A) und mit Umrandung (Abb. B).

Beim Vergleich der sensomotorischen kortikalen Gesamtdicke der scheinoperierten Ratten mit den Tieren zwei Monate nach FFA ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (FFA: $1642 \pm 110 \mu\text{m}$ vs. Sham: $1581 \pm 78 \mu\text{m}$, $p = 0,097$, zweifaktorielle Varianzanalyse, Abb. 15A).

Zur weiteren Exploration des somatosensorischen Kortex erfolgte die Analyse der Barrels in Lamina IV, welche die erste Schaltstelle in der kortikalen Verarbeitung darstellen. Die Varianzanalyse verdeutlichte einen signifikanten Effekt der Behandlung ($p = 0,004$, zweifaktorielle Varianzanalyse, Abb. 15B), welcher mit einem Holm-Sidak-Test für mehrfache Gruppenvergleiche verdeutlicht wurde.

Diese Ergebnisse stellten nach facio-facialer Anastomose eine Verminderung des Durchmessers um 10 % im Vergleich zur Kontrollgruppe fest. Dieses Resultat der

Behandlung zeigte einen signifikanten Effekt (FFA: $215 \pm 18 \mu\text{m}$ vs. Sham: 238 ± 15 , $p = 0,004$, Holm-Sidak-Test, Abb. 15B). Hingegen konnte innerhalb der FFA-Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen der kontralateralen und ipsilateralen Lamina IV des Barrel-Kortex gefunden werden (FFA kontra: $218 \pm 7 \mu\text{m}$ vs. FFA ipsi: $213 \pm 28 \mu\text{m}$, $p = 0,625$, Holm-Sidak-Test, Abb. 15B).

So ließ sich jedoch nachweisen, dass die kontralaterale Lamina IV des Barrel-Kortex nach facio-facialer Anastomose um 11 % kleiner war als die kontralaterale Lamina IV der Kontrollgruppe (FFA kontra: $218 \pm 7 \mu\text{m}$ vs. Sham kontra: $244 \pm 20 \mu\text{m}$, $p = 0,013$, Holm-Sidak-Test, Abb. 15B). Es war ein Trend der kortikalen Dicke zwischen der ipsilateralen Lamina IV und der entsprechenden ipsilateralen Kontrollgruppe zu verzeichnen (FFA ipsi: $213 \pm 28 \mu\text{m}$ vs. Sham ipsi: $231 \pm 10 \mu\text{m}$, $p = 0,073$, Holm-Sidak-Test, Abb. 15B).

Daraus lässt sich schließen, dass die facio-faciale Anastomose zu einer Atrophie der Lamina IV des Barrel-Kortex führte, welche aber vorrangig die kontralaterale Hemisphäre betraf. Denn innerhalb der FFA-Gruppe ließ sich kein Größenunterschied zwischen der ipsi- und kontralateralen Lamina IV des Barrel-Kortex feststellen.

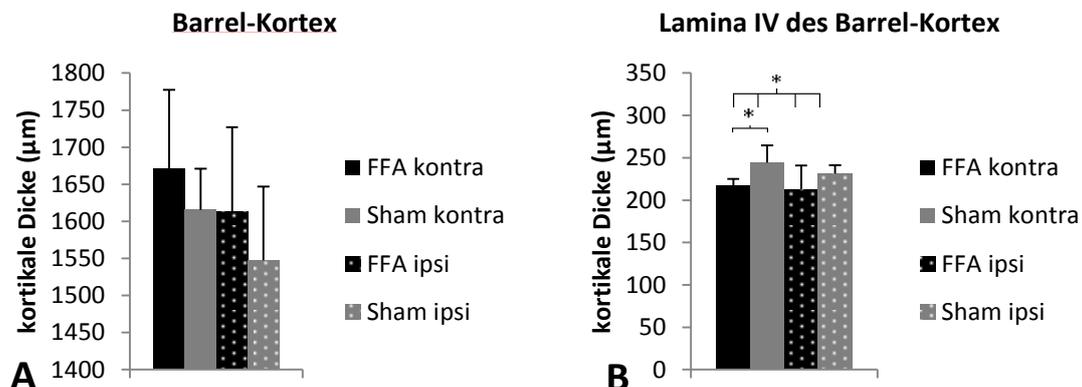


Abb. 15 Analyse der kortikalen Dicke des Barrel-Kortex und seiner Lamina IV

Dargestellt ist der Durchmesser jeweils der kontra- und ipsilateralen Hemisphäre des Barrel-Kortex (Abb. A) und der Lamina IV (Abb. B) von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8). Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung (SD). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Holm-Sidak-Test nach zweifaktorieller Varianzanalyse).

4.2.2 Astrozyten

Viele Erkrankungen im Gehirn gehen einher mit einer Veränderung der Morphologie der Astrozytenpopulation. So lässt sich eine Astrogliose z.B. bei degenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Multipler Sklerose nachweisen (Kettenmann und Verkhratsky 2011).

Wie in 4.2.1 beschrieben, tritt nach peripherer Fazialisläsion eine Atrophie der Lamina IV des Barrel-Kortex in der kontralateralen Hemisphäre auf. Zur weiteren Analyse der kortikalen Umbauprozesse in der Lamina IV erfolgte die immunhistochemische Analyse der Astrozyten mittels S100-Antikörper um eine mögliche astrogläre Mitbeteiligung zu erfassen (Abb. 16).

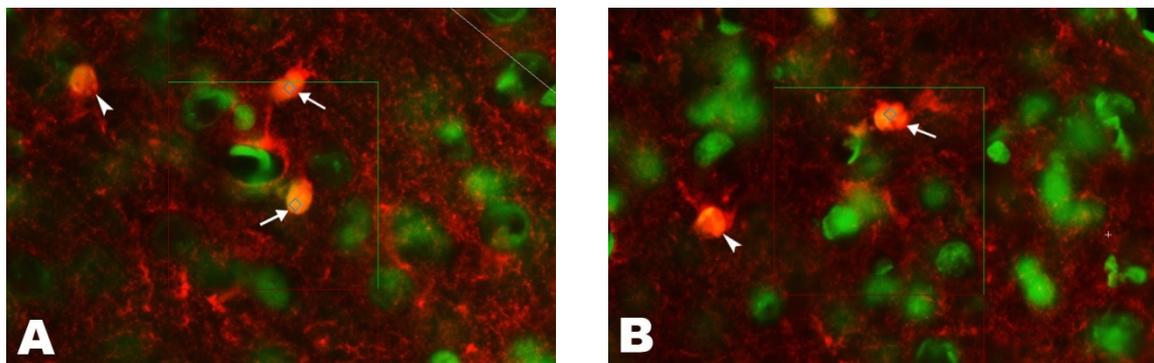


Abb. 16 Darstellung von Astrozyten in der Lamina IV des Barrel-Kortex

Die Abbildungen zeigen zwei repräsentative Bildausschnitte der Lamina IV des Barrel-Kortex in einer S100 – Färbung in 40x Objektivvergrößerung. Dargestellt sind S100⁺ Astrozyten (Pfeile) zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (Abb. A) und Scheinoperation (Abb. B). Die Pfeile stellen Zellen dar, die nach stereologischen Regeln gezählt werden. Zellen mit Pfeilspitzen als Markierung liegen außerhalb des Messareals und dürfen nicht gezählt werden.

Beim Vergleich der Astrozytenanzahl in der Lamina IV des Barrel-Kortex zwei Monate nach FFA, verglichen mit der Kontrollgruppe, ergaben sich in beiden Hemisphären keine signifikanten Unterschiede (FFA: $41,68 \pm 6,94 \times 10^6$ vs. Sham: $36,83 \pm 6,62 \times 10^6$, $p = 0,135$, zweifaktorielle Varianzanalyse, Abb. 17B).

Bezugnehmend zum Referenzvolumen wurden in der Analyse der Astrozytendichte keine signifikanten Veränderungen festgestellt (FFA: $25,38 \pm 2,77 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. Sham: $23,26 \pm 3,47 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p = 0,087$, zweifaktorielle Varianzanalyse, Abb. 17A).

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Lamina IV des somatosensorischen Kortex keiner Astrozytose unterlag. Dennoch erbrachte die Analyse beider Hemisphären eine Tendenz zur Zunahme der S100⁺ Astrozytendichte der FFA-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch könnte dies auch darin begründet liegen, dass eine zunehmende Astrozytendichte das Resultat einer nominellen Zunahme der Astrozytenanzahl und der in 4.2.1 beschriebenen kortikalen Atrophie war.

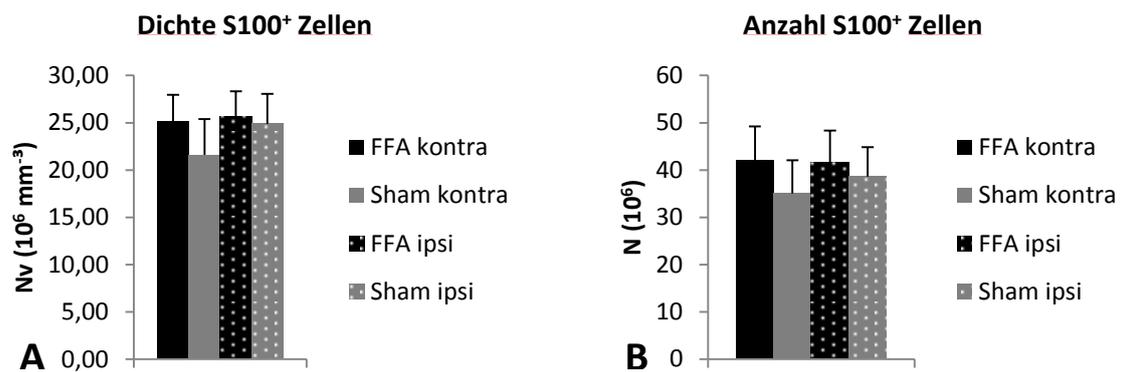


Abb. 17 Quantitative Analyse der Astrozyten der Lamina IV des Barrel-Kortex

Die Abbildung zeigt die numerische Dichte (Nv, Abb. A) und Anzahl (N, Abb. B) der S100⁺ Zellen der kontra- und ipsilateralen Lamina IV des Barrel-Kortex von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8). Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung (SD). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p > 0,087$, zweifaktorielle Varianzanalyse).

4.2.3 VGLUT2

Der Barrel-Kortex ist die zentrale neokortikale Verarbeitungsstation, welche sensorische Informationen aus der Peripherie erhält. Zur näheren Untersuchung dieser exzitatorischen afferenten Informationen aus dem Tastsinn der Vibrissen erfolgte innerhalb der Lamina IV des Barrel-Kortex die quantitative Analyse von glutamatergen Terminalen zwei Monate nach FFA oder Schein-OP. VGLUT2⁺ Terminale kommen aus dem Thalamus und innervieren überwiegend die Lamina IV (Chau et al. 2014). Diese synaptischen Terminale wurden durch VGLUT2-Antikörper immunhistochemisch gefärbt und in der Lamina IV mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt (Abb. 18).

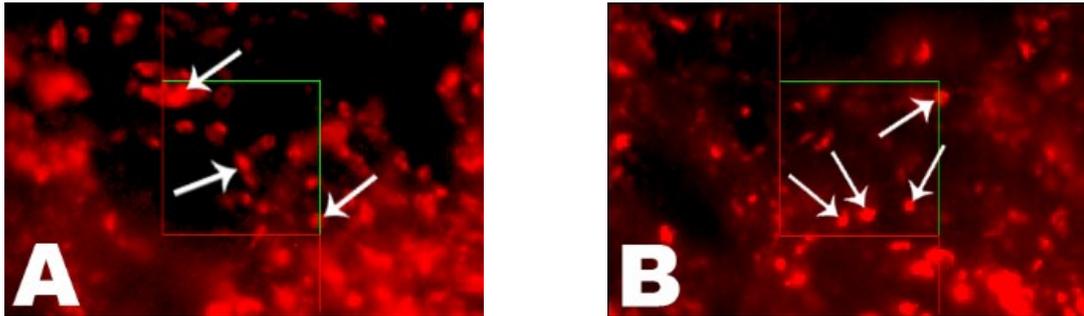


Abb. 18 Darstellung von VGLUT2⁺ Terminalen in der Lamina IV des Barrel-Kortex

Es sind zwei repräsentative Bildausschnitte der Lamina IV in einer VGLUT2 - Färbung in 100x Objektivvergrößerung zu sehen. Die Abbildungen zeigen glutamaterge, exzitatorische Terminale (VGLUT2⁺) in der Lamina IV des Barrel-Kortex (Pfeile) zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (Abb. A) und nach Scheinoperation (Abb. B).

Es konnten zahlreiche Signifikanzen für die nominelle Anzahl und numerische Dichte von VGLUT2⁺ Terminalen nachgewiesen werden.

So zeigte die Varianzanalyse für die Anzahl an VGLUT2⁺ Terminalen signifikante Effekte der Behandlung (ANOVA Treatment, $p < 0,001$, Abb. 19) und der Hemisphärenseite (ANOVA Side, $p = 0,003$, Abb. 19). Diese Effekte wurden mit dem Holm-Sidak Test für mehrfache Gruppenvergleiche verdeutlicht. Es bestätigte sich, dass die facio-faciale Anastomose im Vergleich zur Kontrollgruppe nach zwei Monaten zu einer Abnahme der glutamatergen Terminale in der Lamina IV des Barrel-Kortex um 17 % führte (FFA: $2,76 \pm 0,26 \times 10^6$ vs. Sham: $3,34 \pm 0,21 \times 10^6$, $p < 0,001$, Holm-Sidak-Test, Abb. 19).

Darauf aufbauend ließ sich feststellen, dass die Behandlung, verglichen mit hemisphärenseitigen Kontrollgruppe, sowohl eine Verminderung der nominellen VGLUT2⁺-Terminale um 23 % in der kontralateralen (FFA kontra: $2,52 \pm 0,22 \times 10^6$ vs. Sham kontra: $3,27 \pm 0,29 \times 10^6$, $p < 0,001$, Holm-Sidak-Test, Abb. 19), als auch um 12 % in der ipsilateralen Lamina IV bewirkte (FFA ipsi: $2,99 \pm 0,29 \times 10^6$ vs. Sham ipsi: $3,40 \pm 0,13 \times 10^6$, $p = 0,004$, Holm-Sidak-Test, Abb. 19).

In der Varianzanalyse zeigte sich, dass es ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen kontra- und ipsilateraler Anzahl an VGLUT2⁺ Terminalen gab ($p = 0,003$). In der post-hoc Analyse zeigte sich jedoch, dass diese signifikante Hemisphärendifferenz nur in der FFA-Gruppe ($p = 0,001$) und nicht in der Kontrollgruppe ($p = 0,321$) vorlag. Somit besteht eine Differenz der nominellen exzitatorischen Terminale im Sinne einer Abnahme

um 16 % in der kontralateralen Lamina IV im Vergleich zur ipsilateralen Lamina IV nach FFA (Werte s.o., $p = 0,001$).

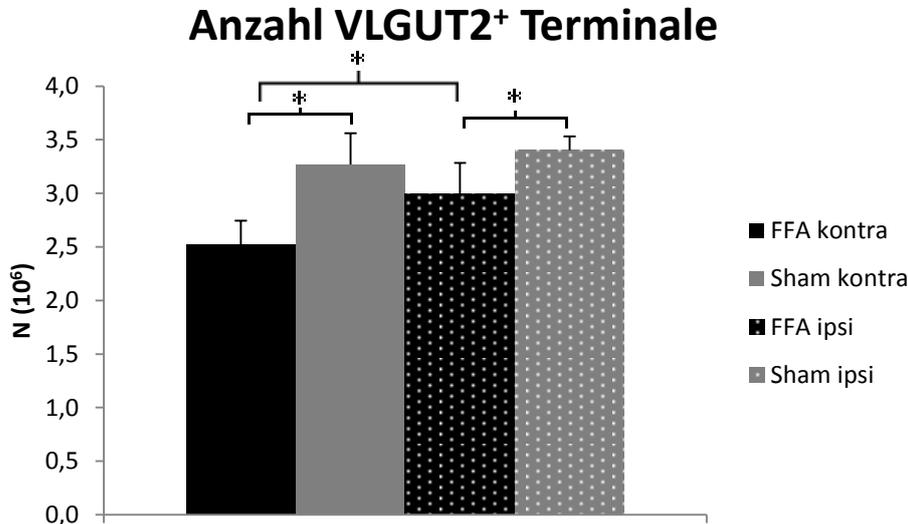


Abb. 19 Quantitative Analyse der Anzahl VGLUT2⁺ Terminale in der Lamina IV des Barrel-Kortex

Die Abbildung zeigt die nominelle Anzahl (N) der glutamatergen, exzitatorischen (VGLUT2⁺) Terminale der kontra- und ipsilateralen Lamina IV des Barrel-Kortex von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8). Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung (SD). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Holm-Sidak-Test nach zweifaktorieller Varianzanalyse).

Für die numerische Dichte von glutamatergen exzitatorischen Synapsen der Lamina IV zeigten sich ähnliche signifikante Effekte. Die Varianzanalyse ergab für die Dichte der VGLUT2⁺-Terminale ebenfalls signifikante Effekte der Hemisphärenseite (ANOVA Side, $p < 0,001$) und der Behandlung (ANOVA Treatment, $p = 0,014$, Abb. 20). Die post-hoc-Analyse erfolgte mit Hilfe des Holm-Sidak-Tests für mehrfache Gruppenvergleiche.

Dabei bestätigte sich, dass die facio-faciale Anastomose statistisch in beiden Lamina IV zusammen nach zwei Monaten zu einer Reduktion der Dichte glutamatergen Terminale um 8 % im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (FFA: $12,89 \pm 1,31 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. Sham: $14,07 \pm 0,83 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p < 0,001$, Holm-Sidak-Test, Abb. 20). Nachfolgend konnte eindeutig differenziert werden, dass die oben beschriebene Abnahme der VGLUT2-Synapsen durch FFA vorrangig im kontralateralen (linken) Barrel-Kortex zu verzeichnen

war. Dort erfolgte eine 14 %ige Abnahme der glutamatergen exzitatorischen Terminale im Vergleich zur kontralateralen Seite der Kontrollgruppe (FFA kontra: $11,57 \pm 0,73 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. Sham kontra: $13,40 \pm 0,75 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p = 0,008$, Holm-Sidak-Test, Abb. 20). Hingegen zeigte sich, dass im ipsilateralen Barrel-Kortex keine Dichtedifferenzen vorhanden waren (FFA ipsi: $14,21 \pm 1,89 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. Sham ipsi: $14,74 \pm 0,91 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p = 0,402$, Holm-Sidak-Test, Abb. 20).

Gleichzeitig zeigte sich ein signifikanter Effekt bezüglich der Hemisphärenseite, so dass hierbei eine um 14 % geringe Dichte im kontralateralen Barrel-Kortex im Vergleich zum ipsilateralen nachzuweisen war (kontralateral: $12,49 \pm 0,74 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. ipsilateral: $14,48 \pm 1,40 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p < 0,001$, Holm-Sidak-Test, Abb. 20). Bei weiterer Analyse stellte sich heraus, dass dies auf einem signifikanten Effekt innerhalb der FFA-Gruppe beruhte. So ergab sich innerhalb der Gruppe der Tiere mit facio-facialer Anastomose eine Abnahme der VGLUT2-Dichte um 19 % im kontralateralen Barrel-Kortex im Vergleich zum ipsilateralen (FFA kontra: $11,57 \pm 0,73 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ vs. FFA ipsi: $14,21 \pm 1,89 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, $p < 0,001$, Holm-Sidak-Test, Abb. 20).

Zusammenfassend sind diese Ergebnisse als komplexe Veränderungen der exzitatorischen synaptischen Verschaltung im Barrel-Kortex zu werten. Es ließen sich nach FFA sowohl multiple Verminderungen der nominellen Anzahl an VGLUT2⁺ Terminalen als auch der numerischen Dichte in Bezug zur Größe des Barrel-Kortex nachweisen. Neben der klassischen kontralateralen 1:1-Vibrissen-Verschaltung, schien auch der ipsilaterale Barrel-Kortex im Rahmen des Trigemino-fazialer-Loop-Mechanismus gewissen Veränderungen in morphologischer als auch quantitativer Ausprägung zu unterliegen.

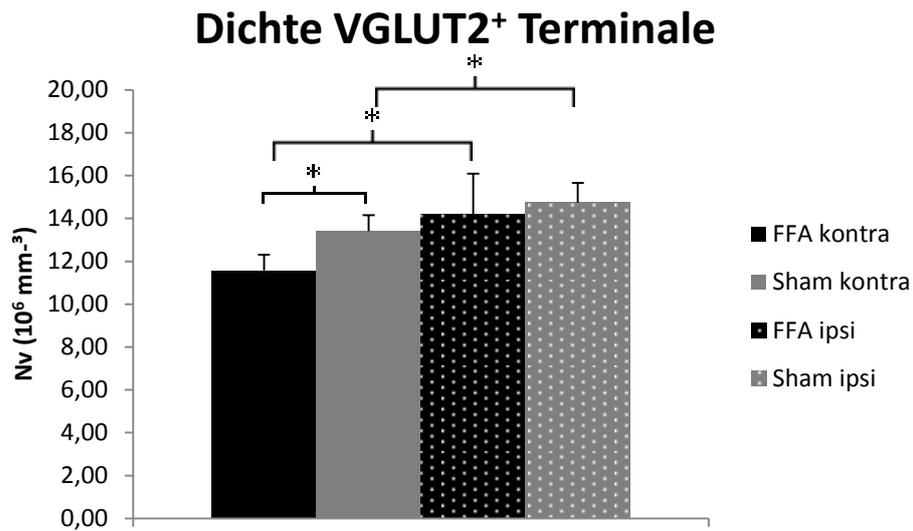


Abb. 20 Quantitative Analyse der Dichte VGLUT2⁺ Terminale in der Lamina IV des Barrel-Kortex

Die Abbildung zeigt die numerische Dichte (Nv) der glutamatergen, exzitatorischen (VGLUT2⁺) Terminale des kontra- und ipsilateralen Barrel-Kortex von scheinoperierten Tieren (Sham, N = 7) und Ratten zwei Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, N = 8). Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung (SD). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Holm-Sidak-Test nach zweifaktorieller Varianzanalyse).

5 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten quantitative morphologische Veränderungen in Barrel-Kortex und Hippocampus zwei Monate nach FFA. Der kontralaterale Hippocampus unterlag in der CA3-Region mit all seinen Subarealen einer Hypertrophie. Weiterhin konnte nach peripherer Fazialisläsion keine Mikrogliose im Hippocampus festgestellt werden. Bei Betrachtung des sensomotorischen Kortex ergab sich eine Atrophie der kontralateralen Lamina IV, jedoch ohne signifikante Astrogliose. Kongruent zum kortikalen Durchmesser nahm auch der thalamische Input in den kontralateralen Barrel-Kortex ab, was durch eine Abnahme der nominellen Anzahl als auch der numerischen Dichte von VGLUT2⁺ Terminalen zu verzeichnen war.

Beide strukturelle Veränderungen in Hippocampus und Barrel-Kortex bestätigen die MRT-Befunde in einer Vorstudie, wo eine Zunahme der Größe in hippocampalen Gebieten und eine Größenminderung im Barrel-Kortex postuliert wurden.

5.1 Hypertrophie des Hippocampus

Im Rahmen der Untersuchungen zeigten sich im Hippocampus zwei Monate nach FFA lediglich im CA3 signifikante volumetrische Veränderungen. Hierbei trat eine Hypertrophie der gesamten Region und aller Subregionen des kontralateralen CA3 im Vergleich zu Kontrollgruppe auf.

Volumetrische Veränderungen des Hippocampus auf unterschiedliche Reize wurden in der Literatur schon vielfach beschrieben (Di Paola et al. 2008, Boutet et al. 2014, Kalman und Keay 2014). Allerdings existieren bisher noch keine Erfahrungen welchen Anpassungsprozessen der Hippocampus nach peripherer Fazialisläsion unterliegt. Weiterhin ist zu eruieren, weshalb eine isolierte Hypertrophie der kontralateralen CA3-Region vorliegt. Gegenwärtig wird eine unterschiedliche Rolle bei Enkodierungs- und Abrufprozessen von anterioren und posterioren Abschnitte des Hippocampus diskutiert. Auf der einen Seite konnte Lepage et al. 1998 den Befund erbringen, dass Enkodierungsprozesse in rostralen Hippocampusarealen und Abrufprozesse in kaudalen Abschnitten stattfinden (Lepage et al. 1998). Auf der anderen Seite konnten fMRT-Ergebnisse zeigen, dass sowohl Enkodierungs- als auch Abrufprozesse mit einer

Aktivierung in posterioren Hippocampusbereichen einhergehen (Schacter und Wagner 1999). Aus diesem Grund ist nicht eindeutig geklärt, ob und welche hippocampalen Anteile einer funktionellen Spezialisierung unterliegen.

Für das räumliche Gedächtnis hingegen konnte bei Ratten nachgewiesen werden, dass die mittleren bis posterioren hippocampalen Abschnitte eine essentielle Bedeutung haben (Moser und Moser 1998). Nachfolgend konnten sowohl tierexperimentelle als auch humanexperimentelle Studien volumetrische Größenzunahmen im Hippocampus nachweisen. 2006 zeigte Draganski et al., dass Medizinstudenten nach einer dreimonatigen Examensvorbereitung eine deutliche Zunahme der Volumina der posterioren Abschnitte der Hippocampi aufwiesen (Draganski et al. 2006). Analog dazu besaßen die posterioren Abschnitte der Hippocampi von Londoner Taxifahrer in einer anderen Studie ein signifikant größeres Volumen als die Kontrollgruppe auf (Maguire et al. 2000). Diese Daten zeigten, dass bei intensivierter und vermehrter Nutzung des räumlichen Gedächtnisinhalts eine hippocampale Hypertrophie entsteht.

Gilbert und Brushfield hatten in ihren tierexperimentellen Versuchen die Bedeutung von Gyrus dentatus, CA3 und CA1 für das räumliche Gedächtnis näher untersucht. Hieraus ergab sich, dass vor allem die CA3-Region eine entscheidende Bedeutung im Abruf von räumlichen Gedächtnisinhalten besitzt (Gilbert und Brushfield 2009).

Die isolierte kontralaterale CA3 Hypertrophie könnte somit Ausdruck einer kompensatorisch vermehrten Nutzung von räumlichen Gedächtnisinhalten sein. Dafür spricht die bedeutende Rolle der CA3-Region bei Abfrage räumlicher Gedächtnisinhalte. Auch die oben beschriebenen Arbeiten von Draganski et al. und Maguire et al. stützen diese Theorie. Als mögliche Mechanismen für diese Ergebnisse können eine Größenzunahme der Nervenzellen, sowie eine mögliche Synaptogenese in Frage kommen. Es existieren jedoch bisher keine Daten über hippocampale Veränderungen nach Fazialisläsion, so dass nur Vermutungen angestellt werden können. Auch die Vielzahl an intrahippocampalen und kortikalen Verschaltungen verdeutlicht die Komplexität des Hippocampus, so dass hier eine multifaktorielle Genese angenommen werden muss.

5.2 Ausbleibende Mikrogliose im Hippocampus

Die Axotomie eines peripheren Nerven führt zu einer reaktiven Mikrogliose im zugehörigen zentralen Kerngebiet (Calvo und Bennett 2012). Funktionell bedeutsam sind die aktivierten Mikrogliazellen primär für die Deafferenzierung von Neuronen und infolge dessen sekundär zur Phagozytose von Zelltrümmern als auch zur Neosynaptogenese innerhalb des Kerngebiets (Bessis et al. 2007, Raslan et al. 2013). Nach Durchtrennung des N. facialis wiesen Raslan et al. eine 6-fach erhöhte Mikrogliazahl zwei Wochen nach Axotomie im Vergleich zur Kontrollgruppe nach. Nach insgesamt zwei Monaten nahm die numerische Anzahl wieder ab, die jedoch immer noch um 22 % höher lag als die Anzahl in der Vergleichsgruppe.

In den Analysen dieser Arbeit konnte zwei Monate nach peripherer Fazialisläsion jedoch keine Mikrogliose im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Zwar kam es im kontralateralen Cornu Ammonis 3 zu einer numerischen Zunahme, diese ist jedoch mit einer volumetrischen Zunahme des Teilgebiets zu erklären, wodurch infolge dessen die Mikroglia-dichte konstant blieb und somit keine realen Veränderungen nachzuweisen waren. Die Ergebnisse legen nahe, dass nach einer Nervendurchtrennung eine Mikrogliose nur im dazugehörigen Kerngebiet auftritt. So konnte gezeigt werden, dass nach Durchtrennung des R. infraorbitalis n. trigemini bei der Ratte bis nach 60 Tagen eine reaktive Mikrogliose im PrV auftrat (Henderson et al. 1993, Golden et al. 1997, Miller und Kuhn 1997). Die Mikrogliazellen sind in direkter räumlicher Nähe der geschädigten Axone lokalisiert, welches als Hinweis für die phagozytotische Aktivität interpretiert wurde (Arvidsson 1979). Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine zeitliche Dynamik dieser Mikrogliose nachgewiesen. Erste Veränderungen sind bereits sieben Tage nach Läsion zu erkennen, die Anzahl der Zellen steigt stetig an, um dann zwischen dem 14. und 60. Tag ein kontinuierlich hohes Plateau zu erreichen.

Auf Grund der oben genannten Erkenntnisse von einer isolierten Mikrogliose im zugehörigen Kerngebiet und einer zeitlichen Dynamik dieser Mikrogliose, lassen sich zwei Annahmen postulieren. Einerseits kommt es nach Fazialisläsion möglicherweise nur zu einer reaktiven Mikrogliose im Ncl. n. facialis und zu keiner Veränderung im afferenten Trigeminiusschenkel und anderen Gehirnregionen. Diese Annahme wird ebenfalls durch den Befund von M. Werle (2014) unterstützt, denn dort trat nach Fazialisläsion ebenfalls keine Mikrogliose im PrV auf.

Andererseits könnte eine abgelaufene Mikrogliose im Hippocampusgebiet schon vor dem definierten Messzeitpunkt von zwei Monate nach FFA vollständig regredient und somit nicht nachweisbar gewesen sein. Mögliche Belege dafür sind zum einen Arbeiten von Arvidsson und Raslan, welche bereits eine zeitliche Komponente der Mikrogliose mit einer Abnahme nach einem Spitzenpeak zeigten. Des Weiteren bezeichnete schon Arvidsson die reaktive Mikrogliose als einen rapiden dynamischen Prozess, welcher in dieser Arbeit bei punktuell erfassten stereologischen Analysen keine Verlaufsbeurteilung zulässt (Arvidsson 1979, Raslan et al. 2013).

5.3 Deafferenzierung des Barrel-Kortex

Eine Läsion des peripheren N. facialis führt zum Verlust der aktiven Beweglichkeit der Vibrissen von Ratten. Damit einhergehend ist nur eine eingeschränkte Umweltexploration möglich. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass trotz des intakten sensorischen Systems der primäre sensorische Reizfluss nach FFA vermindert ist. Eine weitere Möglichkeit den sensorischen Reizfluss zu verringern ist die Deprivation durch das Stutzen oder komplette Abschneiden der Vibrissen. In der Literatur ist neben der Deprivation auch die Reizstimulation ein verbreitetes Modell zur Erforschung von neuronaler Plastizität im primären sensomotorischen Kortex (Kossut 1998, Knott et al. 2002, Holtmaat und Svoboda 2009). So zeigte Knott et al., dass eine kontinuierliche Vibrissenstimulation über 24 Stunden zu einer Zunahme von inhibitorischen Synapsen im Barrel-Kortex führte (Knott et al. 2002). Ein Beispiel für die Deprivation durch das bilaterale Abschneiden von Vibrissen liefert Kossut 1998. Hier konnte nachgewiesen werden, dass zwei Monate nach der Vibrissenentfernung eine erhöhte Zellzahl in Lamina IV zu verzeichnen war (Kossut 1998).

Weitere aktuelle Untersuchungen verdeutlichen, dass schon nach einer kurzen Phase des Reizentzugs axonale Veränderungen an den thalamokortikalen Projektionsfasern auftreten (Wimmer et al. 2010, Oberlaender et al. 2012). Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis darauf, dass schon kurze Zeit nach vermindertem Input, es relativ schnell zu verschiedenen aktivitätsabhängigen kortikalen und synaptischen Plastizitätsveränderungen im Barrel-Kortex kommt (Chau et al. 2013).

Auch in dieser Arbeit konnten Zeichen der Plastizität nachgewiesen werden. Neben einer Abnahme der kortikalen Dicke des kontralateralen (linken) Barrel-Kortex zwei Monate nach FFA um 11 %, ergab die Analyse auch eine Verminderung der Dichte von glutamatergen exzitatorischen Terminale um 14 %. In einer vorangegangenen Arbeit wurde gezeigt, dass exzitatorische Neurone im Barrel-Kortex fast ausschließlich ihren Input vom Ncl. ventralis posteromedialis (VPM) aus dem Thalamus erhalten (Viaene et al. 2011). Diese Erkenntnis legt nahe, dass durch die sensorische Reizabschwächung der peripheren Fazialisläsion ein verminderter afferenter Informationsfluss den Thalamus und schließlich auch den Barrel-Kortex erreicht. Dieser verminderte Input spiegelt sich zum einen in der verminderten Dichte der exzitatorischen Synapsen als auch in der Atrophie des Barrel-Kortex wider. Beide Veränderungen sind sowohl Zeichen der synaptischen als auch kortikalen Plastizität.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass scheinbar auch der ipsilaterale Barrel-Kortex strukturellen Veränderungen unterliegen könnte, auch wenn es sich hierbei lediglich um einen statistischen Trend handelt ($p = 0,073$). Es ist nicht ausreichend erforscht, wie der bilaterale sensorische Input im somatosensorischen Kortex integriert wird. Es existieren Untersuchungen die belegen, dass in höher organisierten kortikalen Regionen Verbindungen sowohl zur kontralateralen als auch ipsilateralen Hemisphäre existieren (Disbrow et al. 2000, Hlushchuk und Hari 2006). Somit kann nur vermutet werden, welche Mechanismen durch eine periphere Fazialisläsion mit anschließender FFA im Barrel-Kortex ausgelöst werden. Möglicherweise unterliegt der ipsilaterale Barrel-Kortex nach FFA rechts durch die partielle bilaterale Verschaltung ebenfalls einer gewissen Atrophie. Auf der anderen Seite wäre es allerdings auch möglich, dass durch die ungenügende taktile Sensorik die Ratten andere Sinnesorgane vermehrt nutzen und in Folge dessen eine partielle Atrophie des ipsilateralen somatosensorischen Kortex auftritt. Diese Arbeit zeigt damit erstmalig, dass nicht nur der veränderte Reizfluss durch Manipulation der Vibrissen zu kortikalen und subkortikalen Veränderungen führt, sondern bereits Störungen im efferente Schenkel des N. facialis zu signifikanten Plastizitätsmodifikationen im Barrel-Kortex führen.

5.4 Reaktionen der Astrozyten im Barrel-Kortex

Auf zellulärer Ebene sind Gliazellen von hoher Bedeutung für neuronale Reorganisationsprozesse (Guthrie et al. 1997). Die Aufgaben von Gliazellen sind vielfältig und reichen von der metabolischen Versorgung der Neurone bis hin zur Signalübertragung. Es werden drei Arten von Gliazellen unterschieden: Oligodendrozyten, Mikroglia und Astrozyten. Da die strukturelle Plastizität mit der synaptischen Plastizität gekoppelt ist, wurden in dieser Arbeit neben den exzitatorischen glutamatergen Terminalen auch die nominelle Anzahl und numerische Dichte von Astrozyten erfasst (Hawrylak und Greenough 1995). Den Astrozyten kommt eine essentielle Bedeutung für die Homöostase des extrazellulären Milieus des ZNS zu. Sie modulieren bei der Signalübertragung die synaptische Transmitterausschüttung durch Aufnahme von Kalium und Kalzium (Keyser und Pellmar 1994, Porter und McCarthy 1996). Eine weitere wichtige Funktion von Astrozyten besteht in der Aufnahme und Metabolisierung von Glutamat aus dem Extrazellulärraum, da dieses dort über einen längeren Zeitraum neurotoxisch wirkt.

In dieser Arbeit konnte im somatosensorischen Kortex bei vorliegender Deafferenzierung ein Trend zur Astroglie im Barrel-Kortex nachgewiesen werden. Es ist allerdings nicht zu klären, ob die Ungenauigkeit der Messungen (hohe Standardabweichungen) die Ursache für die fehlende Signifikanz darstellt, oder ob keine oder noch keine Astroglie vorliegt. In einer anderen Arbeit konnte ein zeitlicher Zusammenhang zwischen auftretender Glie und dem Zelltod in mit einem Neurotoxin behandelten Ratte (MPTP) nachweisen. Dabei stellte sich heraus, dass eine Astroglie erst sekundär zum Zelltod auftrat (Kohutnicka et al. 1998). Auf Grundlage dieser Befunde können verschiedene Theorien die Ergebnisse möglicherweise erklären: Entweder liegt keine Astroglie vor, da zum einen neurodegenerative Veränderungen fehlen und zum anderen eine Astroglie eng an den Zelltod geknüpft ist. Oder es liegen Messungenauigkeiten vor, die eine echte Signifikanz der Astroglie maskieren.

5.5 Synaptische Plastizität

Wie unter Kapitel 5.2 beschrieben, zeigten Untersuchungen im Tiermodell nach Fazialisläsion nur Veränderungen im zugehörigen Kerngebiet. Die Ergebnisse dieser Arbeit

wiesen quantitative morphologische Veränderungen – in Korrelation mit den MRT-Ergebnissen - in primär nicht direkt von der peripheren Fazialisparese betroffenen Gebieten wie Hippocampus und Barrel-Kortex nach. Diese strukturellen Umbauprozesse und dynamischen Veränderungen können im Rahmen der kortikalen und synaptischen Plastizität interpretiert werden.

Die Plastizität der Repräsentationsorten des somatosensorischen Kortex ermöglicht unter der Dynamik von verstärkten oder verminderten sensorischen Input die Repräsentationsgebiete im Kortex zu vergrößern oder zu verkleinern. Diese Modulationen unterliegen scheinbar Adaptationen, die durch verminderten Input wie in diesem Experiment, aber auch nach Nervenverletzungen oder nach Amputationen von Extremitäten, auftreten (Jones et al. 1997). Es wird angenommen, dass die kortikale Plastizität nicht nur einem einfachen anatomischen Konstrukt entspricht, sondern vielmehr das Ergebnis komplexer physiologischer Interaktionen ist und es sich somit eher um eine funktionelle Reorganisation handelt (Calford 2002). Nach Deprivation von Vibrissen bei Ratten konnte eine Langzeitinhibierung von intrakortikalen Synapsen zwischen Lamina IV und II/III im somatosensorischen Kortex festgestellt werden (Allen et al. 2003). Bei Betrachtung dieser Inhibitionsvorgänge und deren raschen Dynamik lässt sich nachweisen, dass diese Inhibitionsvorgänge einen ständigen Input aus der Peripherie erfordern (Calford 2002). Damit lässt sich erklären, warum diese Veränderungen nach Deprivation und nach FFA auftreten.

Neben diesen funktionellen Veränderungen werden auch morphologische Anpassungsprozesse in Form von axonaler Aussprossung beteiligter Neurone angenommen. Bisher existieren keine stereologischen und volumetrischen Analysen von Hippocampus oder Barrel-Kortex zwei Monate nach FFA, wodurch bislang nicht erforscht ist, ob und welche Veränderungen in diesen beiden Arealen nach peripherer Fazialisläsion stattfinden.

Das Gehirn besitzt jedoch Mechanismen um auf solche Veränderungen und Reize zu reagieren. In anderen Modellen zur ZNS-Plastizität zeigte sich, dass es zwei spezifische Anpassungsprozesse auf periphere Nervenläsionen gibt. Zum einen das Sprossen bzw. Sprouting, welches das kollaterale Auswachsen von Axonen bezeichnet (Bishop 1982). Zum anderen die Retraktion, das Zurückziehen von nicht mehr benötigten afferenten Axonen (Bishop 1982). Verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen zeigten einen

Zusammenhang auf kortikaler Ebene zwischen veränderter Repräsentation und axonaler Aussprossung auf (Pons et al. 1991, Darian-Smith und Gilbert 1994, Florence et al. 1998). Ein Beispiel für die Retraktion von Axonen lieferten die Forschungen von Merzenich 1983. Nach Durchtrennung des N. medianus bei Affen konnte eine Verkleinerung des kortikalen Repräsentationsareals des zugehörigen Versorgungsgebiets beschrieben werden. Parallel dazu nahmen die Repräsentationsgebiete des N. ulnaris und N. radialis kompensatorisch zu (Merzenich et al. 1983).

Zur weiteren Erklärung dieser scheinbar indirekten Veränderungen dient das Modell des sensomotorischen Loops (Vaughan und Richardson 1993, Ferreira et al. 1994, Tomov et al. 2002, Guntinas-Lichius 2007, Raslan et al. 2013). Hierbei kommt es unter der Prämisse einer fehlerhaften motorischen Regeneration nach Fazialisparese mit entsprechender geminderter Vibrissenpro- und –Retraktion zu einer konsekutiven Minderinformation des taktilen Apparats. Dieser verminderte Input führt zu einer verringerten Innervation des sensomotorischen Kortex. In Rahmen der neuronalen Plastizität könnte dies zu einer kompensatorischen Zunahme des Volumens des Hippocampus führen. Dieser ist neben der Gedächtniskonsolidierung und dem Lernen auch für die räumliche Orientierung wichtig. Auf Grund der verringerten Umweltreize, könnte dies an Relevanz zunehmen und zu einer entsprechenden kompensatorischen Volumenzunahme führen.

Diese beiden Plastizitätsmodelle könnten auch in dieser Arbeit als Erklärung dienen und einen Beitrag für das hier zu untersuchende trigemino-faziale Loop-Modell liefern. Die Volumenzunahme in CA3 im Hippocampus könnte möglicherweise ein Effekt der Axonsprossung von kreuzverschalteten Interneuronen sein, mit dem Ziel kompensatorisch zu einer stärkeren Ausprägung der räumlichen Orientierung zu führen.

In diesem Kontext der neuronalen Plastizität lassen sich auch die Ergebnisse des Barrel-Kortex interpretieren. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Atrophie des kontralateralen Barrel-Kortex nach FFA könnte sich somit ebenfalls durch die o.g. Plastizitätsprozesse nach Deprivation einordnen. Bei dieser Arbeit konnten die vorhandenen Vibrissen der rechten Seite nach peripherer Fazialisläsion rechts durch das motorische Defizit lediglich passive erhaltene Informationen weiterleiten. Eine Arbeit von Angelov et al. konnte nachweisen, dass repetitive Stimulationen der motorisch defekten Vibrissen die vollständige Genesung der Vibrissen fördert (Angelov et al. 2007).

Ein weiterer Ausdruck der Atrophie im Barrel-Kortex ist die aufgezeigte Dichteminderung von exzitatorischen glutamatergen Terminalen. Sie sind ein Ausdruck der Deafferenzierung des Barrel-Kortex und können durch die o.g. Retraktion von Axonen nach vermindertem Input erklärt werden. Welchen Veränderungen der VPM im Thalamus als Hauptafferenzgebiet der Lamina IV unterliegt, lässt sich in dieser Arbeit nicht klären und müsste dahingehend in nachfolgenden Studien untersucht werden.

Es gibt Hinweise darauf, dass neben der kontralaterale Verschaltung von peripher nach zentral auch eine ipsilaterale Verschaltung vorliegt. Die gefundene Tendenz zur atrophischen Veränderungen des ipsilateralen Barrel-Kortex gliedert sich in die aktuelle Fachliteratur ein. So konnte Reinecke et al. nachweisen, dass sich Veränderungen der rezeptiven Felder nicht nur auf die kontralaterale Seite ausdehnen, sondern auch auf ipsilaterale Areale (Reinecke et al. 2003). Das bedeutet, dass kortikale Plastizität bilateral stattfindet. Diese Entdeckung lässt allerdings offen, an welchen Orten kortikale Plastizität entsteht und welche kortikalen und subkortikalen Strukturen daran beteiligt sind. Wang und Wall gehen davon aus, dass sowohl kortikale als auch subkortikale Strukturen an der Generierung von Plastizität beteiligt sind und sich gegenseitig beeinflussen (Wang und Wall 2005, Wang und Wall 2006). Dieses Modell zeigt auch die Komplexität der intrakortikalen Verschaltungen auf und könnte ebenfalls die simultanen Veränderungen in Hippocampus und Barrel-Kortex erklären.

Es ist allerdings zu beachten, dass in vielen Untersuchungen zum Verständnis der neuronalen Plastizität tierexperimentelle Studien genutzt werden, es jedoch Hinweise gibt, dass sich Menschen und Nagetiere in bestimmten zentralnervösen Reorganisationsprozessen unterscheiden (Jain et al. 2000).

6 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit wies am Rattenmodell zwei Monate nach Fazialisschädigung erstmalig Veränderungen in Hippocampus und somatosensorischen Kortex nach.

Folge der Fazialisschädigung war eine Deafferenzierung sowohl des kontralateralen als auch des ipsilateralen somatosensorischen Kortex. Dies zeigte sich durch eine Abnahme der kortikalen Dicke und der numerischen Dichte von VGLUT2⁺ Terminalen. Weiterhin konnte keine Astrozytose im Barrel-Kortex festgestellt werden. Die atrophischen Veränderungen waren vermutlich eine Folge der reduzierten kortikofugalen Innervation.

Im Hippocampus waren zwei Monate nach FFA strukturelle Alterationen vor allem im CA3 ausgeprägt. In allen Subregionen von CA3 nahm das Volumen signifikant zu. Diese Größenzunahme konnte im Sinne der ZNS-Plastizität als kompensatorische Reaktion auf den verminderten peripheren Input gewertet werden. Weiterhin zeigte sich im Hippocampus und seinen Subregionen keine reaktive Mikroglie, wie sie sonst nach peripheren Nervenläsionen im zugehörigen Kerngebiet gefunden werden.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aldskogius H. 2011. Mechanisms and consequences of microglial responses to peripheral axotomy. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3:857-868.
- Allen C B, Celikel T, Feldman D E. 2003. Long-term depression induced by sensory deprivation during cortical map plasticity in vivo. *Nat Neurosci*, 6(3):291-299.
- Angelov D N, Ceynowa M, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Grosheva M, Kiryakova S I, Skouras E, Maegele M, Irintchev A, Neiss W F, Sinis N, Alvanou A, Dunlop S A. 2007. Mechanical stimulation of paralyzed vibrissal muscles following facial nerve injury in adult rat promotes full recovery of whisking. *Neurobiol Dis*, 26(1):229-242.
- Angerer M, Pfadenhauer K, Stohr M. 1993. Prognosis of facial palsy in *Borrelia burgdorferi* meningopolyradiculoneuritis. *J Neurol*, 240(5):319-321.
- Armstrong-James M, Fox K, Das-Gupta A. 1992. Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. *J Neurophysiol*, 68(4):1345-1358.
- Arvidsson J. 1979. An ultrastructural study of transganglionic degeneration in the main sensory trigeminal nucleus of the rat. *J Neurocytol*, 8(1):31-45.
- Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Wurzinger L. 2010. *Duale Reihe: Anatomie*. Zweite Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Bai L, Xu H, Collins J F, Ghishan F K. 2001. Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem*, 276(39):36764-36769.
- Bale M R, Davies K, Freeman O J, Ince R A, Petersen R S. 2013. Low-dimensional sensory feature representation by trigeminal primary afferents. *J Neurosci*, 33(29):12003-12012.
- Barea-Rodriguez E J, Rivera D T, Jaffe D B, Martinez J L, Jr. 2000. Protein synthesis inhibition blocks the induction of mossy fiber long-term potentiation in vivo. *J Neurosci*, 20(22):8528-8532.
- Barnett E M, Evans G D, Sun N, Perlman S, Cassell M D. 1995. Anterograde tracing of trigeminal afferent pathways from the murine tooth pulp to cortex using herpes simplex virus type 1. *J Neurosci*, 15(4):2972-2984.
- Barron K D, Marciano F F, Amundson R, Mankes R. 1990. Perineuronal glial responses after axotomy of central and peripheral axons. A comparison. *Brain Res*, 523(2):219-229.
- Bascom D A, Schaitkin B M, May M, Klein S. 2000. Facial nerve repair: a retrospective review. *Facial Plast Surg*, 16(4):309-313.
- Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A. 2007. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, 55(3):233-238.
- Beuche W, Friede R L. 1984. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol*, 13(5):767-796.
- Bishop B. 1982. Neural plasticity. Part 4. Lesion-induced reorganization of the CNS: recovery phenomena. *Phys Ther*, 62(10):1442-1451.
- Bishop B. 1982. Neural plasticity: Part 3. Responses to lesions in the peripheral nervous system. *Phys Ther*, 62(9):1275-1282.
- Blinzinger K, Kreutzberg G. 1968. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 85(2):145-157.

- Bliss T V, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232(2):331-356.
- Boutet C, Chupin M, Lehericy S, Marrakchi-Kacem L, Epelbaum S, Poupon C, Wiggins C, Vignaud A, Hasboun D, Defontaines B, Hanon O, Dubois B, Sarazin M, Hertz-Pannier L, Colliot O. 2014. Detection of volume loss in hippocampal layers in Alzheimer's disease using 7 T MRI: a feasibility study. *Neuroimage Clin*, 5:341-348.
- Brecht M, Preilowski B, Merzenich M M. 1997. Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behav Brain Res*, 84(1-2):81-97.
- Brecknell J E, Fawcett J W. 1996. Axonal regeneration. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 71(2):227-255.
- Brodal A. 1981. *Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine*. Dritte Aufl. USA: Oxford University Press.
- Brodman K. 1909. *Vergleichende Lokalisationlehre der Großhirnrinde*. Leipzig: Barth.
- Büttner R, Thomas C. 2003. *Allgemeine Pathologie*. 3. Auflage. Stuttgart: Schattauer.
- Calford M B. 2002. Dynamic representational plasticity in sensory cortex. *Neuroscience*, 111(4):709-738.
- Calvo M, Bennett D L. 2012. The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury. *Exp Neurol*, 234(2):271-282.
- Carpenter M. 1983. *Human Neuroanatomy*. Achte Aufl. Williams & Wilkins.
- Carvell G E, Simons D J. 1990. Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci*, 10(8):2638-2648.
- Chau L S, Akhtar O, Mohan V, Kondilis A, Galvez R. 2014. Rapid adult experience-dependent anatomical plasticity in layer IV of primary somatosensory cortex. *Brain Res*, 1543:93-100.
- Chau L S, Davis A S, Galvez R. 2013. Neocortical synaptic proliferation following forebrain-dependent trace associative learning. *Behav Neurosci*, 127(2):285-292.
- Chiaia N L, Rhoades R W, Bennett-Clarke C A, Fish S E, Killackey H P. 1991. Thalamic processing of vibrissal information in the rat. I. Afferent input to the medial ventral posterior and posterior nuclei. *J Comp Neurol*, 314(2):201-216.
- Chudler E H, Dong W K, Kawakami Y. 1985. Tooth pulp-evoked potentials in the monkey: cortical surface and intracortical distribution. *Pain*, 22(3):221-233.
- Coker N J. 1991. Management of traumatic injuries to the facial nerve. *Otolaryngol Clin North Am*, 24(1):215-227.
- Coleman M P, Conforti L, Buckmaster E A, Tarlton A, Ewing R M, Brown M C, Lyon M F, Perry V H. 1998. An 85-kb tandem triplication in the slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(17):9985-9990.
- Darian-Smith C, Gilbert C D. 1994. Axonal sprouting accompanies functional reorganization in adult cat striate cortex. *Nature*, 368(6473):737-740.
- Darrouzet V, Duclos J Y, Liguoro D, Truilhe Y, De Bonfils C, Bebear J P. 2001. Management of facial paralysis resulting from temporal bone fractures: Our experience in 115 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 125(1):77-84.
- Davis R E, Telischi F F. 1995. Traumatic facial nerve injuries: review of diagnosis and treatment. *J Craniomaxillofac Trauma*, 1(3):30-41.
- De Diego-Sastre J I, Prim-Espada M P, Fernandez-Garcia F. 2005. [The epidemiology of Bell's palsy]. *Rev Neurol*, 41(5):287-290.

- Dent E W, Gertler F B. 2003. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, 40(2):209-227.
- Dhikav V, Anand K S. 2007. Is hippocampal atrophy a future drug target? *Med Hypotheses*, 68(6):1300-1306.
- Di Paola M, Caltagirone C, Fadda L, Sabatini U, Serra L, Carlesimo G A. 2008. Hippocampal atrophy is the critical brain change in patients with hypoxic amnesia. *Hippocampus*, 18(7):719-728.
- Diamond M E, Petersen R S, Harris J A. 1999. Learning through maps: functional significance of topographic organization in primary sensory cortex. *J Neurobiol*, 41(1):64-68.
- Dinse H R, Merzenich M M. 2002. *Perceptual Learning: Adaptation of Inputs in the Somatosensory System*. London: MIT Press.
- Disbrow E, Roberts T, Krubitzer L. 2000. Somatotopic organization of cortical fields in the lateral sulcus of Homo sapiens: evidence for SII and PV. *J Comp Neurol*, 418(1):1-21.
- Dorfl J. 1985. The innervation of the mystacial region of the white mouse: A topographical study. *J Anat*, 142:173-184.
- Dori I, Dinopoulos A, Cavanagh M E, Parnavelas J G. 1992. Proportion of glutamate- and aspartate-immunoreactive neurons in the efferent pathways of the rat visual cortex varies according to the target. *J Comp Neurol*, 319(2):191-204.
- Draganski B, Gaser C, Kempermann G, Kuhn H G, Winkler J, Buchel C, May A. 2006. Temporal and spatial dynamics of brain structure changes during extensive learning. *J Neurosci*, 26(23):6314-6317.
- Drake R, Vogl W, Mitchell A. 2007. *Gray's Anatomie für Studenten*. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Engstrom M, Berg T, Stjernquist-Desatnik A, Axelsson S, Pitkaranta A, Hultcrantz M, Kanerva M, Hanner P, Jonsson L. 2008. Prednisolone and valaciclovir in Bell's palsy: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet Neurol*, 7(11):993-1000.
- Evison J, Aebi C, Francioli P, Péter O, Basetti S, Gervaix A, Zimmerli S, Weber R. 2005. *Abklärung und Therapie der Lyme-Borreliose bei Erwachsenen und Kindern*. Schweiz: Schweizerische Ärztezeitung.
- Eysel U T, Schweigart G. 1999. Increased receptive field size in the surround of chronic lesions in the adult cat visual cortex. *Cereb Cortex*, 9(2):101-109.
- Falkai P, Vogeley K, Maier W. 2001. [Structural brain changes in patients with schizophrenic psychoses. From focal pathology to network disorder]. *Nervenarzt*, 72(5):331-341.
- Ferreira M C, Besteiro J M, Tuma Junior P. 1994. Results of reconstruction of the facial nerve. *Microsurgery*, 15(1):5-8.
- Florence S L, Taub H B, Kaas J H. 1998. Large-scale sprouting of cortical connections after peripheral injury in adult macaque monkeys. *Science*, 282(5391):1117-1121.
- Fox S E, Ranck J B, Jr. 1975. Localization and anatomical identification of theta and complex spike cells in dorsal hippocampal formation of rats. *Exp Neurol*, 49(1 Pt 1):299-313.
- Frotscher M, Heimrich B, Schwegler H. 1990. Plasticity of identified neurons in slice cultures of hippocampus: a combined Golgi/electron microscopic and immunocytochemical study. *Prog Brain Res*, 83:323-339.

- Frotscher M, Kugler P, Misgeld U, Zilles K. 1988. Neurotransmission in the Hippocampus: Neuronal Elements in the Hippocampus and Their Synaptic Connections. Heidelberg: Springer.
- Gilbert P E, Brushfield A M. 2009. The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: a process oriented behavioral assessment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33(5):774-781.
- Gilden D H. 2004. Clinical practice. Bell's Palsy. *N Engl J Med*, 351(13):1323-1331.
- Glass J D, Schryer B L, Griffin J W. 1994. Calcium-mediated degeneration of the axonal cytoskeleton in the Ola mouse. *J Neurochem*, 62(6):2472-2475.
- Glassman R B. 1994. Behavioral specializations of SI and SII cortex: a comparative examination of the neural logic of touch in rats, cats, and other mammals. *Exp Neurol*, 125(1):134-141.
- Golden J P, Demaro J A, Robinson P L, Jacquin M F. 1997. Development of terminals and synapses in laminae I and II of the rat medullary dorsal horn after infraorbital nerve transection at birth. *J Comp Neurol*, 383(3):339-348.
- Gordon-Weeks P R. 2009. Neuronal Growth Cones. Cambridge University Press.
- Graziano A, Liu X B, Murray K D, Jones E G. 2008. Vesicular glutamate transporters define two sets of glutamatergic afferents to the somatosensory thalamus and two thalamocortical projections in the mouse. *J Comp Neurol*, 507(2):1258-1276.
- Guntinas-Lichius O. 2004. The facial nerve in the presence of a head and neck neoplasm: assessment and outcome after surgical management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 12(2):133-141.
- Guntinas-Lichius O. 2007. [Rehabilitation options for lesions of the facial nerve]. *HNO*, 55(8):605-612.
- Guntinas-Lichius O, Angelov D N. 2008. [Experimental studies for the improvement of facial nerve regeneration]. *HNO*, 56(2):122-130.
- Guntinas-Lichius O, Angelov D N, Stennert E, Neiss W F. 1997. Delayed hypoglossal-facial nerve suture after predegeneration of the peripheral facial nerve stump improves the innervation of mimetic musculature by hypoglossal motoneurons. *J Comp Neurol*, 387(2):234-242.
- Guntinas-Lichius O, Angelov D N, Tomov T L, Dramiga J, Neiss W F, Wewetzer K. 2001. Transplantation of olfactory ensheathing cells stimulates the collateral sprouting from axotomized adult rat facial motoneurons. *Exp Neurol*, 172(1):70-80.
- Guntinas-Lichius O, Effenberger K, Angelov D N, Klein J, Streppel M, Stennert E, Neiss W F. 2000. Delayed rat facial nerve repair leads to accelerated and enhanced muscle reinnervation with reduced collateral axonal sprouting during a definite denervation period using a cross-anastomosis paradigm. *Exp Neurol*, 162(1):98-111.
- Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M, Lenzen M, Grosheva M, Wewetzer K, Neiss W F, Angelov D N. 2005. Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in the rat: combined structural and functional analyses. *Eur J Neurosci*, 21(2):391-402.
- Guntinas-Lichius O, Straesser A, Streppel M. 2007. Quality of life after facial nerve repair. *Laryngoscope*, 117(3):421-426.
- Guntinas-Lichius O, Streppel M, Stennert E. 2006. Postoperative functional evaluation of different reanimation techniques for facial nerve repair. *Am J Surg*, 191(1):61-67.
- Guntinas-Lichius O, Wewetzer K, Tomov T L, Azzolin N, Kazemi S, Streppel M, Neiss W F, Angelov D N. 2002. Transplantation of olfactory mucosa minimizes axonal

- branching and promotes the recovery of vibrissae motor performance after facial nerve repair in rats. *J Neurosci*, 22(16):7121-7131.
- Guntinas-Lichius O, Wittekindt C. 2003. The role of growth factors for disease and therapy in diseases of the head and neck. *DNA Cell Biol*, 22(9):593-606.
- Guthrie K M, Woods A G, Nguyen T, Gall C M. 1997. Astroglial ciliary neurotrophic factor mRNA expression is increased in fields of axonal sprouting in deafferented hippocampus. *J Comp Neurol*, 386(1):137-148.
- Hawrylak N, Greenough W T. 1995. Monocular deprivation alters the morphology of glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytes in the rat visual cortex. *Brain Res*, 683(2):187-199.
- Hayashi H. 1980. Distributions of vibrissae afferent fiber collaterals in the trigeminal nuclei as revealed by intra-axonal injection of horseradish peroxidase. *Brain Res*, 183(2):442-446.
- Hebb D O. 1949. *The Organization of Behavior: a neuro-psychological theory*. New York: Wiley&Sons.
- Henderson T A, Rhoades R W, Bennett-Clarke C A, Osborne P A, Johnson E M, Jacquin M F. 1993. NGF augmentation rescues trigeminal ganglion and principalis neurons, but not brainstem or cortical whisker patterns, after infraorbital nerve injury at birth. *J Comp Neurol*, 336(2):243-260.
- Hermey G, Mahlke C, Schwake M, Sommer T. 2010. *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. Heidelberg: Spektrum.
- Hlushchuk Y, Hari R. 2006. Transient suppression of ipsilateral primary somatosensory cortex during tactile finger stimulation. *J Neurosci*, 26(21):5819-5824.
- Holtmaat A, Svoboda K. 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*, 10(9):647-658.
- House J W, Brackmann D E. 1985. Facial nerve grading system. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 93(2):146-147.
- Howard C V, Reed M G. 1998. *Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. Zweite Auflage. New York: Springer-Verlag.
- Hubel D H, Wiesel T N, Stryker M P. 1977. Orientation columns in macaque monkey visual cortex demonstrated by the 2-deoxyglucose autoradiographic technique. *Nature*, 269(5626):328-330.
- Hundeshagen G, Szameit K, Thieme H, Finkensieper M, Angelov D N, Guntinas-Lichius O, Irintchev A. 2013. Deficient functional recovery after facial nerve crush in rats is associated with restricted rearrangements of synaptic terminals in the facial nucleus. *Neuroscience*.
- Huttunen J, Kobal G, Kaukoranta E, Hari R. 1986. Cortical responses to painful CO₂ stimulation of nasal mucosa; a magnetoencephalographic study in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 64(4):347-349.
- Ide C. 1996. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res*, 25(2):101-121.
- Irintchev A, Rollenhagen A, Troncoso E, Kiss J Z, Schachner M. 2005. Structural and functional aberrations in the cerebral cortex of tenascin-C deficient mice. *Cereb Cortex*, 15(7):950-962.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*, 57(1):1-9.
- Iwata N, Kitai S T, Olson S. 1972. Afferent component of the facial nerve: its relation to the spinal trigeminal and facial nucleus. *Brain Res*, 43(2):662-667.

- Jain N, Florence S L, Qi H X, Kaas J H. 2000. Growth of new brainstem connections in adult monkeys with massive sensory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(10):5546-5550.
- Jensen K F, Killackey H P. 1987. Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. I. The normal morphology of specific thalamocortical afferents. *J Neurosci*, 7(11):3529-3543.
- Jiao Y, Sun Z, Lee T, Fusco F R, Kimble T D, Meade C A, Cuthbertson S, Reiner A. 1999. A simple and sensitive antigen retrieval method for free-floating and slide-mounted tissue sections. *J Neurosci Methods*, 93(2):149-162.
- Jones E G. 2000. Cortical and subcortical contributions to activity-dependent plasticity in primate somatosensory cortex. *Annu Rev Neurosci*, 23:1-37.
- Jones E G, Diamond I T. 1995. The barrel cortex of rodents. 11. New York: Springer.
- Jones E G, Manger P R, Woods T M. 1997. Maintenance of a somatotopic cortical map in the face of diminishing thalamocortical inputs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(20):11003-11007.
- Jones L L, Banati R B, Graeber M B, Bonfanti L, Raivich G, Kreutzberg G W. 1997. Population control of microglia: does apoptosis play a role? *J Neurocytol*, 26(11):755-770.
- Kaas J H. 1997. Topographic maps are fundamental to sensory processing. *Brain Res Bull*, 44(2):107-112.
- Kalman E, Keay K A. 2014. Different patterns of morphological changes in the hippocampus and dentate gyrus accompany the differential expression of disability following nerve injury. *J Anat*.
- Kauderer B S, Kandel E R. 2000. Capture of a protein synthesis-dependent component of long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(24):13342-13347.
- Kelly J P, Dodd J. 1991. Trigeminal System. New York: Elsevier.
- Kesner R P. 2007. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn Mem*, 14(11):771-781.
- Kettenmann B, Hummel C, Stefan H, Kobal G. 1996. Multichannel magnetoencephalographical recordings: separation of cortical responses to different chemical stimulation in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*, 46:271-274.
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. 2013. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*, 77(1):10-18.
- Kettenmann H, Verkhratsky A. 2011. [Neuroglia--living nerve glue]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 79(10):588-597.
- Keyser D O, Pellmar T C. 1994. Synaptic transmission in the hippocampus: critical role for glial cells. *Glia*, 10(4):237-243.
- Khodaie B, Lotfinia A A, Ahmadi M, Lotfinia M, Jafarian M, Karimzadeh F, Coulon P, Gorji A. 2014. Structural and functional effects of social isolation on the hippocampus of rats with traumatic brain injury. *Behav Brain Res*.
- Killackey H P. 1973. Anatomical evidence for cortical subdivisions based on vertically discrete thalamic projections from the ventral posterior nucleus to cortical barrels in the rat. *Brain Res*, 51:326-331.
- Klingner C M, Volk G F, Brodoehl S, Witte O W, Guntinas-Lichius O. 2014. The effects of deafferentation without deafferentation on functional connectivity in patients with facial palsy. *Neuroimage Clin*, 6:26-31.

- Klingner C M, Volk G F, Maertin A, Brodoehl S, Burmeister H P, Guntinas-Lichius O, Witte O W. 2011. Cortical reorganization in Bell's palsy. *Restor Neurol Neurosci*, 29(3):203-214.
- Knott G W, Quairiaux C, Genoud C, Welker E. 2002. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron*, 34(2):265-273.
- Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A, Czlonkowska A. 1998. Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology*, 39(3):167-180.
- Kossut M. 1998. Experience-dependent changes in function and anatomy of adult barrel cortex. *Exp Brain Res*, 123(1-2):110-116.
- Kreutzberg G W. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19(8):312-318.
- Lazarides E. 1982. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu Rev Biochem*, 51:219-250.
- Lepage M, Habib R, Tulving E. 1998. Hippocampal PET activations of memory encoding and retrieval: the HIPER model. *Hippocampus*, 8(4):313-322.
- Li X G, Somogyi P, Ylinen A, Buzsaki G. 1994. The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol*, 339(2):181-208.
- Lindholm D, Heumann R, Hengerer B, Thoenen H. 1988. Interleukin 1 increases stability and transcription of mRNA encoding nerve growth factor in cultured rat fibroblasts. *J Biol Chem*, 263(31):16348-16351.
- Lockerbie R O. 1987. The neuronal growth cone: a review of its locomotory, navigational and target recognition capabilities. *Neuroscience*, 20(3):719-729.
- Lorch M, Teach S J. 2010. Facial nerve palsy: etiology and approach to diagnosis and treatment. *Pediatr Emerg Care*, 26(10):763-769; quiz 770-763.
- Lorente de Nò R. 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex. II Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol*, 46:113-177.
- Lorente de Nò R (1938). *Architectonics and structure of the cerebral cortex. Physiology of the nervous system.* London, Oxford University Press: 291-327.
- Lu S M, Lin R C. 1993. Thalamic afferents of the rat barrel cortex: a light- and electron-microscopic study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin as an anterograde tracer. *Somatosens Mot Res*, 10(1):1-16.
- Lundborg G. 1987. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand*, 58(2):145-169.
- Maguire E A, Gadian D G, Johnsrude I S, Good C D, Ashburner J, Frackowiak R S, Frith C D. 2000. Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8):4398-4403.
- Manni J J, Beurskens C H, van de Velde C, Stokroos R J. 2001. Reanimation of the paralyzed face by indirect hypoglossal-facial nerve anastomosis. *Am J Surg*, 182(3):268-273.
- Margerison J H, Corsellis J A. 1966. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*, 89(3):499-530.
- Martin S J, Morris R G. 2001. Cortical plasticity: It's all the range! *Curr Biol*, 11(2):R57-59.

- May M, Sobol S M, Mester S J. 1991. Hypoglossal-facial nerve interpositional-jump graft for facial reanimation without tongue atrophy. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 104(6):818-825.
- Meier C, Sollmann H. 1977. Regeneration of cauda equina fibres after transection and end-to-end suture. Light and electron microscopic study in the pig. *J Neurol*, 215(2):81-90.
- Mennenga S E, Baxter L C, Grunfeld I S, Brewer G A, Aiken L S, Engler-Chiurazzi E B, Camp B W, Acosta J I, Braden B B, Schaefer K R, Gerson J E, Lavery C N, Tsang C W, Hewitt L T, Kingston M L, Koebele S V, Patten K J, Ball B H, McBeath M K, Bimonte-Nelson H A. 2014. Navigating to new frontiers in behavioral neuroscience: traditional neuropsychological tests predict human performance on a rodent-inspired radial-arm maze. *Front Behav Neurosci*, 8:294.
- Merzenich M M, Kaas J H, Wall J T, Sur M, Nelson R J, Felleman D J. 1983. 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(3):639-665.
- Millaruelo A I, Nieto-Sampedro M, Cotman C W. 1988. Cooperation between nerve growth factor and laminin or fibronectin in promoting sensory neuron survival and neurite outgrowth. *Brain Res*, 466(2):219-228.
- Miller M W, Kuhn P E. 1997. Neonatal transection of the infraorbital nerve increases the expression of proteins related to neuronal death in the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve. *Brain Res*, 769(2):233-244.
- Moran L B, Graeber M B. 2004. The facial nerve axotomy model. *Brain Res Brain Res Rev*, 44(2-3):154-178.
- Moser M B, Moser E I. 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8(6):608-619.
- Mountcastle V B. 1957. Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol*, 20(4):408-434.
- Nadel L, MacDonald L. 1980. Hippocampus: cognitive map or working memory? *Behav Neural Biol*, 29(3):405-409.
- Naumann H, Helms J, Herberhold C, Kastenbauer E. 1994. *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis*. Bd 1: Ohr. Stuttgart New York: Thieme.
- Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A. 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*, 82(4):163-201.
- Nudo R J, Wise B M, SiFuentes F, Milliken G W. 1996. Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science*, 272(5269):1791-1794.
- O'Keefe J, Dostrovsky J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*, 34(1):171-175.
- O'Keefe J, Nadel L. 1978. *The Hippocampus as a Cognitive map*. Oxford: Oxford University Press.
- Oberlaender M, Ramirez A, Bruno R M. 2012. Sensory experience restructures thalamocortical axons during adulthood. *Neuron*, 74(4):648-655.
- Olton D S, Papas B C. 1979. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17(6):669-682.
- Ouyang Y, Rosenstein A, Kreiman G, Schuman E M, Kennedy M B. 1999. Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca(2+)/calmodulin-dependent

- protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 19(18):7823-7833.
- Peeva G P, Angelova S K, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Irintchev A, Schutz U, Popratiloff A, Savaskan N E, Brauer A U, Alvanou A, Nitsch R, Angelov D N. 2006. Improved outcome of facial nerve repair in rats is associated with enhanced regenerative response of motoneurons and augmented neocortical plasticity. *Eur J Neurosci*, 24(8):2152-2162.
- Peitersen E. 1982. The natural history of Bell's palsy. *Am J Otol*, 4(2):107-111.
- Pierret T, Lavallee P, Deschenes M. 2000. Parallel streams for the relay of vibrissal information through thalamic barreloids. *J Neurosci*, 20(19):7455-7462.
- Plunet W, Kwon B K, Tetzlaff W. 2002. Promoting axonal regeneration in the central nervous system by enhancing the cell body response to axotomy. *J Neurosci Res*, 68(1):1-6.
- Pons T P, Garraghty P E, Ommaya A K, Kaas J H, Taub E, Mishkin M. 1991. Massive cortical reorganization after sensory deafferentation in adult macaques. *Science*, 252(5014):1857-1860.
- Porter J T, McCarthy K D. 1996. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci*, 16(16):5073-5081.
- Raisman G, Cowan W M, Powell T P. 1966. An experimental analysis of the efferent projection of the hippocampus. *Brain*, 89(1):83-108.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss C U, Werner A, Jones L L, Kreutzberg G W. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev*, 30(1):77-105.
- Raslan A, Ernst P, Werle M, Thieme H, Szameit K, Finkensieper M, Guntinas-Lichius O, Irintchev A. 2013. Reduced cholinergic and glutamatergic synaptic input to regenerated motoneurons after facial nerve repair in rats: potential implications for recovery of motor function. *Brain Struct Funct*.
- Rauber A, Kopsch F, Leonhardt H, Tillmann B, Zilles K. 1988. *Anatomie des Menschen*, in 4 Bdn., Bd.4, Topographie der Organsysteme, Systematik der peripheren Leitungsbahnen. Stuttgart: Thieme.
- Reddy P G, Arden R L, Mathog R H. 1999. Facial nerve rehabilitation after radical parotidectomy. *Laryngoscope*, 109(6):894-899.
- Reier P J, Houle J D. 1988. The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. *Adv Neurol*, 47:87-138.
- Reinecke S, Dinse H R, Reinke H, Witte O W. 2003. Induction of bilateral plasticity in sensory cortical maps by small unilateral cortical infarcts in rats. *Eur J Neurosci*, 17(3):623-627.
- Robillard R B, Hilsinger R L, Jr., Adour K K. 1986. Ramsay Hunt facial paralysis: clinical analyses of 185 patients. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 95(3 Pt 1):292-297.
- Rohen J, Lütjen-Drecoll E. 2006. *Funktionelle Anatomie des Menschen*. Elfte Aufl. Stuttgart New York: Schattauer.
- Ronthal M. 2011. Bell's palsy: Pathogenesis, clinical features, and diagnosis in adults.
- Rowlands S, Hooper R, Hughes R, Burney P. 2002. The epidemiology and treatment of Bell's palsy in the UK. *Eur J Neurol*, 9(1):63-67.
- Sampedro-Piquero P, Zancada-Menendez C, Cuesta M, Arias J L, Begega A. 2014. Metabolic brain activity underlying behavioural performance and spatial strategy choice in sedentary and exercised Wistar rats. *Neuroscience*.

- Schacter D L, Wagner A D. 1999. Medial temporal lobe activations in fMRI and PET studies of episodic encoding and retrieval. *Hippocampus*, 9(1):7-24.
- Schiebler T, Korf H. 2007. Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. Zehnte Aufl. Steinkopff.
- Schlaepfer W W, Hasler M B. 1979. Characterization of the calcium-induced disruption of neurofilaments in rat peripheral nerve. *Brain Res*, 168(2):299-309.
- Scholz E, Langer J, Begall K. 2007. [Recurrent facial paresis with facial neurinoma]. *Laryngorhinootologie*, 86(6):443-447.
- Schröder J. 1999. Pathologie des Nervensystems VIII: Pathologie peripherer Nerven. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer.
- Schrott L M. 1997. Effect of training and environment on brain morphology and behavior. *Acta Paediatr Suppl*, 422:45-47.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. 2009. PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie. Zweite Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Schwegler H, Crusio W E, Brust I. 1990. Hippocampal mossy fibers and radial-maze learning in the mouse: a correlation with spatial working memory but not with non-spatial reference memory. *Neuroscience*, 34(2):293-298.
- Seckel B R. 1990. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve*, 13(9):785-800.
- Seddon H J. 1942. A Classification of Nerve Injuries. *Br Med J*, 2(4260):237-239.
- Shepherd G. 2003. The Synaptic Organization of the Brain. Fifth Edition. New York: Oxford University Press.
- Simons D J. 1997. Rodent Whisker Barrels: Window into cerebral cortical funktion. *News Physiol. Sci*.
- Smith R L. 1973. The ascending fiber projections from the principal sensory trigeminal nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 148(4):423-445.
- Sofroniew M V. 2005. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*, 11(5):400-407.
- Sofroniew M V, Schrell U. 1982. Long-term storage and regular repeated use of diluted antisera in glass staining jars for increased sensitivity, reproducibility, and convenience of single- and two-color light microscopic immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*, 30(6):504-511.
- Squire L R. 1986. Mechanisms of memory. *Science*, 232(4758):1612-1619.
- Stennert E. 1979. I. Hypoglossal facial anastomosis: its significance for modern facial surgery. II. Combined approach in extratemporal facial nerve reconstruction. *Clin Plast Surg*, 6(3):471-486.
- Streit W J, Semple-Rowland S L, Hurley S D, Miller R C, Popovich P G, Stokes B T. 1998. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol*, 152(1):74-87.
- Sullivan F M, Swan I R, Donnan P T, Morrison J M, Smith B H, McKinstry B, Davenport R J, Vale L D, Clarkson J E, Hammersley V, Hayavi S, McAteer A, Stewart K, Daly F. 2007. Early treatment with prednisolone or acyclovir in Bell's palsy. *N Engl J Med*, 357(16):1598-1607.
- Swanson L W, Sawchenko P E, Cowan W M. 1981. Evidence for collateral projections by neurons in Ammon's horn, the dentate gyrus, and the subiculum: a multiple retrograde labeling study in the rat. *J Neurosci*, 1(5):548-559.
- Thomas W E. 1992. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev*, 17(1):61-74.

- Tomov T L, Guntinas-Lichius O, Grosheva M, Streppel M, Schraermeyer U, Neiss W F, Angelov D N. 2002. An example of neural plasticity evoked by putative behavioral demand and early use of vibrissal hairs after facial nerve transection. *Exp Neurol*, 178(2):207-218.
- Trepel M. 2012. *Neuroanatomie, Struktur und Funktion*. 5. Auflage. München: Elsevier GmbH.
- Vaughan E D, Richardson D. 1993. Facial nerve reconstruction following ablative parotid surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 31(5):274-280.
- Viaene A N, Petrof I, Sherman S M. 2011. Synaptic properties of thalamic input to layers 2/3 and 4 of primary somatosensory and auditory cortices. *J Neurophysiol*, 105(1):279-292.
- Vincent S B. 1912. The function of the vibrissae in the behavior of the white rat. *Behavior Monographs* 1:1.81.
- Wang X, Wall J T. 2005. Cortical influences on sizes and rapid plasticity of tactile receptive fields in the dorsal column nuclei. *J Comp Neurol*, 489(2):241-248.
- Wang X, Wall J T. 2006. Cortical influences on rapid brainstem plasticity. *Brain Res*, 1095(1):73-84.
- Wartman B C, Gabel J, Holahan M R. 2014. Inactivation of the anterior cingulate reveals enhanced reliance on cortical networks for remote spatial memory retrieval after sequential memory processing. *PLoS One*, 9(10):e108711.
- Welker C. 1971. Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of (Sml) cerebral neocortex in albino rat. *Brain Res*, 26(2):259-275.
- Werle M. 2014. *Strukturelle Veränderungen im Nucleus principalis nervi trigemini nach Läsionen des Nervus facialis*. Inauguraldissertation, Universität Jena.
- Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. 2000. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*, 24(7):1016-1019.
- West M J. 1993. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging*, 14(4):275-285.
- Wimmer V C, Broser P J, Kuner T, Bruno R M. 2010. Experience-induced plasticity of thalamocortical axons in both juveniles and adults. *J Comp Neurol*, 518(22):4629-4648.
- Woolsey T A, Van der Loos H. 1970. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res*, 17(2):205-242.
- Yamada M, Ohsawa K, Imai Y, Kohsaka S, Kamitori S. 2006. X-ray structures of the microglia/macrophage-specific protein Iba1 from human and mouse demonstrate novel molecular conformation change induced by calcium binding. *J Mol Biol*, 364(3):449-457.
- Zimmerman U P, Schlaepfer W W. 1984. Multiple forms of Ca-activated protease from rat brain and muscle. *J Biol Chem*, 259(5):3210-3218.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Anordnung der Gefrierschnitte auf den Objektträgern	21
Abb. 2 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz	23
Abb. 3 Stereologische Analyse am Mikroskop	26
Abb. 4 Darstellung des Barrel-Kortex mittels grün fluoreszierende Nissl-Färbung	27
Abb. 5 Volumenbestimmung des Hippocampus	31
Abb. 6 Volumetrische Analyse des Gyrus dentatus	32
Abb. 7 Volumetrische Analyse des Cornu Ammonis 3	34
Abb. 8 Volumetrische Analyse des Cornu Ammonis 1	35
Abb. 9 Darstellung von Mikrogliazellen im Hippocampus	36
Abb. 10 Quantitative Analyse der Mikrogliazellen des Hippocampus	37
Abb. 11 Quantitative Analyse der Mikrogliazellen der Subregionen des Hippocampus	38
Abb. 12 Quantitative Analyse der Mikroglia-dichte des Hippocampus	39
Abb. 13 Quantitative Analyse der Mikroglia-dichte der Subregionen des Hippocampus	40
Abb. 14 Fluoreszierende Nissl-Färbung der Lamina IV des Barrel-Kortex	41
Abb. 15 Analyse der kortikalen Dicke des Barrel-Kortex und seiner Lamina IV	42
Abb. 16 Darstellung von Astrozyten in der Lamina IV des Barrel-Kortex	43
Abb. 17 Quantitative Analyse der Astrozyten der Lamina IV des Barrel-Kortex	44
Abb. 18 Darstellung von VGLUT2 ⁺ Terminalen in der Lamina IV des Barrel-Kortex	45
Abb. 19 Quantitative Analyse der Anzahl VGLUT2 ⁺ Terminale in der Lamina IV des Barrel-Kortex	46
Abb. 20 Quantitative Analyse der Dichte VGLUT2 ⁺ Terminale in der Lamina IV des Barrel-Kortex	48

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Zusammensetzung verwendeter Pufferlösungen	20
Tab. 2 Darstellung verwendeter Antikörper	22
Tab. 3 Zusammensetzung verwendeter Puffer- und Blockierlösung	22
Tab. 4 Disektormaße zur stereologischen Analyse	25
Tab. 5 Analysis of Variances (ANOVA) des Gyrus dentatus	32
Tab. 6 Analysis of Variances (ANOVA) des Cornu Ammonis 1	35

8.3 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Irintchev für die direkte Betreuung und Beratung während der gesamten Zeit der experimentellen Arbeit und Erstellung dieser Dissertation danken.

In gleichem Maße danke ich Frau Heike Thieme, die mir ebenfalls mit fachkundiger Unterstützung zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für Fragen oder Probleme hatte.

Unterstützung erhielt ich auch aus meinem privaten Umfeld. Somit möchte ich mich an dieser Stelle vor allem bei meiner Freundin Kristin und meiner Familie für die kontinuierliche Motivation danken.

Abschließend möchte ich mich jedoch auch bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Guntinas-Lichius bedanken, der es mir erst ermöglichte bei diesem spannenden Forschungsprojekt mitzuwirken.

8.4 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Georg Gohla
Geburtsdaten: 13.12.1987 in Rudolstadt
Adresse: Plönnesstr. 31, 23560 Lübeck
Telefon / E-Mail: 0176-81797808 / georggohla@gmx.de

Schulbildung

08/1998 – 06/2006 Gymnasium Fridericianum, Rudolstadt, Abitur

Universitäre Ausbildung

10/2006 – 09/2008 Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, FSU Jena
10/2008 – 11/2012 Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, FSU Jena
09/2013 Approbation als Arzt

Beruflicher Werdegang

01/2014 – 07/2014 Assistenzarzt für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
Klinikum Sankt Georg, Leipzig
Seit 08/2014 Studienarzt / Wissenschaftlicher Mitarbeiter für den
SFB Transregio 134 („Selfish Brain“) der Deutschen
Forschungsgemeinschaft
Sektion Psychoneurobiologie der Universität zu Lübeck

Lübeck, den 16.12.2014

Georg Gohla

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena 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. Orlando Guntinas-Lichius, Priv.-Doz. Dr. Andrey Irintchev und Heike Thieme,

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.

Lübeck, den 16.12.2014

Georg Gohla