

**Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid-
oder Stressexposition auf die Aktivität der
Stressachse, das Verhalten und das Outcome
nach ischämischem Schlaganfall bei der
adulten Maus**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Von

Franz Krönert

geboren am 13.10.1987 in Jena

Gutachter:

1. apl. Prof. Dr. med. Matthias Schwab, Jena
2. apl. Prof. Dr. med. Reinhard Bauer, Jena
3. apl. Prof. Dr. med. Christoph Redecker, Lemgo

Tag der öffentlichen Verteidigung:

04.06.2019

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2 EINLEITUNG.....	3
2.1 Die pränatale Glucocorticoid-Therapie und ihre klinische Bedeutung.....	3
2.2 Fetale Programmierung	3
2.3 Der Einfluss von perinatalem Stress und synthetischen Glucocorticoiden auf die Entwicklung der Stressachse	4
2.3.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse	4
2.3.2 Die Programmierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden- Achse durch perinatalen Stress und synthetische Glucocorticoide	5
2.3.3 Vulnerable Phasen für eine perinatale Programmierung	7
2.4 Der Einfluss von perinatalem Stress und synthetischen Glucocorticoiden auf das Verhalten.....	9
2.5 Der Einfluss von perinatalem Stress und synthetischen Glucocorticoiden auf die Immunantwort	10
2.6 Der Einfluss von perinatalem Stress und synthetischen Glucocorticoiden auf die Gefäßfunktion	11
2.7 Epidemiologische und pathophysiologische Zusammenhänge zwischen Schlaganfall und Depression	13
3 ZIELE DER ARBEIT	15
4 MATERIAL UND METHODEN	17
4.1 Übersicht des Versuchsablaufes.....	17
4.2 Perinatale Glucocorticoid – oder Stressexposition	18
4.3 Zyklussynchronisation	19
4.4 Corticosteron-Stressantwort.....	20
4.5 Beurteilung des Verhaltens	23

4.6 Schlaganfallinduktion durch MCAO	24
4.7 Beurteilung des funktionellen Outcomes nach MCAO	26
4.7.1 Score nach Bederson	26
4.7.2 Gridwalk-Test	28
4.7.3 Global-Score zur Beurteilung des funktionellen Outcomes nach MCAO	30
4.8 Histologische Beurteilung der Schlaganfallgröße	34
4.8.1 Kresylviolett-Färbung	34
4.8.2 Immunhistochemische Färbungen	34
4.8.3 Bestimmung der Infarktgröße	35
4.9 Statistische Auswertung	36
5 ERGEBNISSE	37
5.1 Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf die Aktivität der HHN-Achse	37
5.2 Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf das Verhalten	41
5.3 Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf das funktionelle Outcome nach MCAO	43
5.4 Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf die Infarktgröße nach MCAO	44
6 DISKUSSION	51
6.1 Diskussion der Methoden	51
6.1.1 Die Maus als Versuchstier	51
6.1.2 Perinatale Glucocorticoid- oder Stressexposition	52
6.1.3 Akuter Immobilitätsstress als Modell für Kurzzeitstress	54
6.1.4 Der Schwanzhalteversuch zur Quantifizierung depressiven Verhaltens	55
6.1.5 Die Okklusion der A. cerebri media als Schlaganfallmodell	55
6.1.6 Motorische Tests zur Beurteilung des funktionellen Outcomes	57

6.1.7	Verwendete Färbungen zur Darstellung des Hirninfarktes	59
6.2	Diskussion der Ergebnisse	62
6.2.1	Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf die Aktivität der HHN-Achse	62
6.2.2	Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf das Verhalten	65
6.2.3	Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf das Schlaganfall-Outcome	69
7	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	73
8	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	75
9	ANHANG	89
9.1	Färbeprotokolle	89
9.2	Deskriptive Statistik zur Corticosteron-Stressantwort	92
9.3	Danksagung	94
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	95

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ l	Mikroliter	IFN- γ	Interferon- γ
11 β -HSD2	11 β -Hydroxysteroid- Dehydrogenase Typ 2	IL-1 β	Interleukin 1 β
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin	k	Kontrollgruppe
ACI	Arteria carotis interna	kg	Kilogramm
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	MAP2	Mikrotubuli assoziiertes Protein 2
AUC	Fläche unter der Kurve, Area under the Curve	MCA	Arteria cerebri media
BM	Betamethason	MCAO	operative Okklusion der Arteria cerebri media
BSA	Rinderserumalbumin	mg	Milligramm
CD	Cluster of Differentiation	min	Minute
cm	Zentimeter	ml	Milliliter
CORT	Corticosteron	mm	Millimeter
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon	mM	millimolar
CV	Kresylviolett	MR	Mineralocorticoid-Rezeptoren
DM	Dexamethason	MS	Postnatale Mutterseparation
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NDS	Normal donkey serum
ET 1	Endothelin 1	NIH	National Institutes of Health
GC	Glucocorticoid	NO	Stickstoffmonoxid
GC [E16/17]	Pränatale Glucocorticoid- Therapie an den Tagen 16 und 17 der Gestation	PSD	Post-Stroke-Depression
GFAP	Saures Gliafaserprotein	RNA	Ribonukleinsäure
GR	Glucocorticoid-Rezeptoren	sGC	Synthetische Glucocorticoide
h	Stunde	SHRP	Stress-hyporesponsive Periode
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	TBS	Tris buffered saline-Puffer
		TIFF	Tagged image file format
		TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
		TX	Thromboxan A ₂

1 ZUSAMMENFASSUNG

Bei drohender Frühgeburt steht der Perinatalmedizin mit der pränatalen Glucocorticoid-Therapie eine Behandlungsoption zur Verfügung, welche die Lungenreifung des Fetus beschleunigt und so die Mortalität der Frühgeburtlichkeit deutlich senken kann. Glucocorticoide (GC) stellen einen unspezifischen Reifungsstimulus dar, der jedoch nicht nur die Lunge adressiert, da Glucocorticoid-Rezeptoren (GR) ubiquitär vorkommen. Die systemische Gabe beeinflusst somit auch die Reifung anderer Organsysteme, die gerade in Entwicklung begriffen sind, wie die der HHN-Achse selbst, des vaskulären Systems oder des Gehirns. So kann eine pränatale GC-Exposition über eine epigenetisch vermittelte Desensitivierung der in die negative Rückkopplung der HHN-Achse involvierten GR zu einer zeitlebens verstärkter GC-Ausschüttung führen und im späteren Leben für stressassoziierte Erkrankungen, wie zum Beispiel vaskuläre oder neuropsychiatrische Erkrankungen, prädisponieren. Hierzu können unter anderem GC-vermittelte Effekte auf die Reifung des vaskulären Systems oder des Gehirns beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob eine pränatale Glucocorticoidgabe im Mausmodell depressives Verhalten begünstigt und ob die Intervention zu größeren Schlaganfällen im adulten Nagergehirn sowie zu einem schlechteren funktionellen Outcome führt. Zudem wurde untersucht, ob diese Parameter von der Aktivität der HHN-Achse und vom Geschlecht der Tiere abhängen. Hierzu wurden 15 weibliche und 10 männliche Mäuse der Rasse C57/Bl6 an den Tagen E16 und E17 (Geburt an E21) pränatal mit Dexamethason in der zur Lungenreifungsinduktion verwendeten Dosierung von je 0,17 mg pro kg Körpergewicht (entspricht 12 mg für eine 70 kg schwere Schwangere) behandelt. Da die HHN-Achse von Mäusen als unreif geborene Spezies auch noch postnatal reift und somit ein Stressreiz nach der Geburt ebenfalls einen potenziell programmierenden Effekt auf die Stressachse hat, wurde bei weiteren 13 weiblichen und 10 männlichen Tieren die Mutterseparation an den postnatalen Tagen vier bis 14 als perinataler Stressor angewendet. Im Alter von sechs Monaten durchliefen alle Tiere ein einheitliches Protokoll, bei dem die Antwort der HHN-Achse auf einen zwanzigminütigen Restraint-Stress untersucht und depressives Verhalten mit einem Schwanzhalteversuch quantifiziert wurden. Anschließend wurde durch eine dreißigminütige Okklusion der A. cerebri media (MCAO) eine zerebrale Ischämie induziert. Sieben Tage nach MCAO wurde das funktionelle Schlaganfalloutcome mit dem Test nach Bederson und dem Gridwalk-Test beurteilt. Zudem wurde die Infarktgröße

volumetrisch mittels der Kresylviolett-färbung bestimmt. Das immunhistochemische Anfärben der Proteine des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 2 (MAP2) und des sauren Gliafaserproteins (GFAP) erlaubte Aussagen über die Größe der Penumbra und der Gliosezone im Bereich des Infarktes.

Nach pränataler GC-Gabe zeigten sowohl die männlichen als auch die weiblichen Tiere im Alter von sechs Monaten ein signifikant stärker ausgeprägtes depressives Verhalten. In Folge der postnatalen Mutterseparation wiesen nur die Männchen ein depressiveres Verhalten auf. Ein vermutlich zu Grunde liegender Pathomechanismus, die Hyperaktivität der Stressachse, ließ sich sowohl nach pränataler GC-Gabe als auch nach Mutterseparation nur für die weiblichen Tiere nachweisen. Dies lässt auf eine komplexe Genese der depressiven Störung schließen, die über eine alleinige Erklärung einer hyperresponsiven Stressachse hinausgeht. Nach MCAO zeigten die Männchen und die Weibchen in Folge einer pränataler GC-Gabe größere Infarktareale in der MAP2-Färbung und ein schlechteres funktionelles Schlaganfall-Outcome. Da für die Männchen keine Fehlregulation der HPA-Achse nachgewiesen werden konnte, scheinen weitere Mechanismen wie die Programmierung eines erhöhten zerebralen Vasotonus mit verminderter gegenregulatorischer zerebraler Vasodilatation nach MCAO ursächlich zu sein. Nach postnataler Mutterseparation zeigte sich bei beiden Geschlechtern kein Effekt auf die Infarktgröße und das Schlaganfall-Outcome. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Stressreiz entweder nicht stark genug war oder dass die Mutterseparation zu einem Zeitpunkt einwirkte, an dem das Gefäßsystem nicht vulnerabel für diesen Stressreiz war.

Mit dem vorliegenden tierexperimentellen Versuch wurde gezeigt, dass eine pränatale Exposition zu synthetischen GC, selbst wenn sie nur von kurzer Dauer ist, geschlechtsabhängig die Programmierung einer überschießenden Stressantwort und depressiven Verhaltens sowie ein verschlechtertes Schlaganfall-Outcome zur Folge haben kann. Die Gabe synthetischer GC zur Lungenreifeinduktion sollte in Kenntnis dieser lebenslangen extrapulmonalen Effekte - trotz seiner großen klinischen Bedeutung in der Behandlung Frühgeborener - weiterhin mit einer engen Indikationsstellung angewandt werden, solange keine weiterführenden Studien hinsichtlich der Langzeitwirkungen beim Menschen vorliegen.

2 EINLEITUNG

2.1 Die pränatale Glucocorticoid-Therapie und ihre klinische Bedeutung

In Deutschland wurden im Jahr 2015 etwa 64.000 Kinder vor Ablauf der 37. Schwangerschaftswoche geboren (AQUA 2016). Dies entspricht einer Frühgeburtsrate von 8,9 %. Die Morbidität von Frühgeborenen ist geprägt vom Atemnotsyndrom und seinen Komplikationen (AQUA 2016). Mit der pränatalen Gabe von GC, welche die Reifung der Lunge fördern, sodass die Atmung ermöglicht wird, verfügt die Perinatalmedizin über ein wirkungsvolles Instrument, die Inzidenz und die Schwere jener Erkrankung abzumildern (Liggins und Howie 1972, Schmidt et al. 2011). Es fand Mitte der 1990er Jahre Eingang in die klinische Praxis, indem die amerikanischen National Institutes of Health (NIH) die pränatale Anwendung von GC empfahlen (NIH 1995, Crowley 1995).

Die aktuellen Leitlinien sehen bei drohender Frühgeburt für Frauen zwischen der 24. und 34. Schwangerschaftswoche eine einmalige Gabe von Betamethason (BM; 2x 12mg an zwei aufeinanderfolgenden Tagen) oder Dexamethason [DM; 4x 6mg alle 12 Stunden, (American College of and Gynecologists Committee on Obstetric 2008, Sweet et al. 2007, DGGG 2008)] vor. Die Behandlung kann neben Vorteilen in Bezug auf das Überleben des Frühgeborenen langfristig auch ungünstige Folgen auf den Organismus haben, da die pränatale GC-Therapie einen pränatalen Stressreiz darstellt, für den der Fetus hinsichtlich seiner Entwicklung vulnerabel ist.

2.2 Fetale Programmierung

Pränataler Stress kann dazu führen, dass der fetale Organismus Veränderungen erfährt, die Entwicklung der Struktur und Funktion unterschiedlichster Organe langfristig beeinflussen (Cottrell und Seckl 2009). Dieser Prozess wird als fetale Programmierung bezeichnet (Cottrell und Seckl 2009, Schwab 2009). Die wichtigsten pränatalen Stressreize sind neben einer pränatalen GC-Therapie mütterlicher psychologischer Stress während der Schwangerschaft und eine Mangelversorgung des Fetus. Aus evolutionsbiologischer Sicht sind Anpassungsvorgänge an intrauterin erlebte Umweltbedingungen sinnvoll, da sie dem Organismus zum Beispiel in einer stressreichen Umgebung einen Überlebensvorteil in Form erhöhter Wachsamkeit verschaffen oder bei vorherrschender Nahrungsmittelknappheit in Form eines angepassten Stoffwechsels eine optimale Nährstoffausbeute ermöglichen (Glover 2011, Gluckman et al. 2005a). Bleiben die erwarteten Lebensumstände nach der Geburt

jedoch aus oder besteht am Beispiel einer fetalen Mangelversorgung postnatal gar ein Überangebot an Nährstoffen, kann eine solche Anpassung an pränatalen Stress zu einer erhöhten Prädisposition für Krankheiten im späteren Leben führen, deren Spektrum von psychiatrischen Auffälligkeiten wie Verhaltensstörungen und Depression bis hin zu kardiovaskulären Erkrankungen reicht (Cottrell und Seckl 2009). Dies konnte anhand einer Vielzahl epidemiologischer Studien gezeigt werden (Louey und Thornburg 2005, Lupien et al. 2009, Barker 1998). Die genannten Krankheitsbilder stellen am Beispiel des Schlaganfalls und der Depression aufgrund ihrer hohen Prävalenz und des resultierenden Behandlungsaufwandes wichtige gesamtgesellschaftliche Herausforderungen unserer Zeit dar. Da sie im Laufe des Lebens häufig erst nach der Reproduktionsphase phänotypisch manifest werden, sind sie aus evolutionsbiologischer Sicht im Hinblick auf die Selektion nicht ausschlaggebend (Schwab 2009). Das bedeutet, dass die transgenerationale Weitergabe einer erhöhten Prädisposition für Schlaganfall und Depression durch Evolutionsmechanismen nicht verhindert wird. In der Pathogenese beider Erkrankungen spielt die fetale Programmierung der HHN-Achse und des Gefäßsystems durch prä-, aber auch durch frühe postnatale Stressreize eine entscheidende Rolle.

2.3 Der Einfluss von perinatalem Stress und synthetischen Glucocorticoiden auf die Entwicklung der Stressachse

2.3.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Bevor im weiteren Verlauf auf die Beeinflussung der Aktivität der HHN-Achse im späteren Leben durch pränatalen Stress und die Applikation synthetischer GC (sGC) und deren sekundäre Effekte eingegangen wird, soll zunächst grundlegend der Aufbau und die Funktionsweise der Stressachse erläutert werden.

Neben der basalen Aktivität der HHN-Achse, welche einer zirkadianen Rhythmik unterliegt und unter anderem an der Regulation des Schlaf-Wachrhythmus beteiligt ist, wird die HHN-Achse vor allem in Stresssituationen aktiviert (De Kloet et al. 1998). Das pulsatil freigesetzte Corticotropin-Releasing Hormons (CRH) gelangt über den hypothalamisch-hypophysären Pfortaderkreislauf zur Hirnanhangsdrüse und stimuliert dort basophile Zellen des Hypophysenvorderlappens zur Produktion des adrenocorticotropen Hormons (ACTH). Ein ACTH-Anstieg im systemischen Blutkreislauf bewirkt in der Nebennierenrinde wiederum die Sekretion von Cortisol (Munck et al. 1984). Dieses wirkt auf den Ebenen von Hypophyse und

Hypothalamus seiner eigenen Neubildung entgegen, wodurch die Stressreaktion limitiert wird (Aguilera 2011). Dieser Vorgang wird als negative Rückkopplung der Hormonachse bezeichnet.

Es lassen sich verschiedene Typen von Steroidrezeptoren nachweisen, über die das speziesspezifische Effektorhormon der HHN-Achse [Cortisol beim Menschen, Corticosteron (CORT) beim Nager; im Folgenden synonym verwendet] wirkt. Man unterscheidet Mineralocorticoid- und GC-Rezeptoren (MR und GR). Während GR im Gehirn ubiquitär exprimiert werden, kommen MR innerhalb des Gehirns vor allem im Hypothalamus sowie in Strukturen des limbischen Systems vor, insbesondere im Hippocampus (Reul und de Kloet 1985). Im Vergleich zu GR haben MR eine größere Affinität zu CORT und zeigen bereits bei hohen physiologischen Konzentrationen einen Sättigungseffekt (De Kloet et al. 1998). Dies spricht dafür, dass der MR die basale Aktivität der HHN-Achse in Abwesenheit von Stressreizen vermittelt (De Kloet et al. 1998). Im Rahmen einer Stressreaktion und bei supraphysiologischen GC-Konzentrationen, wie einer pharmakologischen Gabe, bindet CORT primär an GR (Veldhuis et al. 1982, de Kloet et al. 1987). GR sind in den negativen Feedback-Mechanismus der HHN-Achse involviert (Dallman et al. 1992). Darüber hinaus beeinflussen GC über den GR die Hirnfunktion. So führen längerfristig erhöhte CORT-Konzentrationen zu einer Verminderung der Erregbarkeit von Neuronen im Hippocampus, scheinen jedoch auch eine Rolle bei Lernvorgängen zu spielen (Oitzl et al. 1998, Joels et al. 2006, De Kloet et al. 1998).

Ist der beschriebene Regelkreis während seiner Reifung intrauterin sGC oder hohen CORT-Spiegeln in Folge pränatalen Stresses ausgesetzt, so kann dies zu einer lebenslangen Störung in der Regulation der Stressantwort führen, wie im folgenden Kapitel erläutert werden soll.

2.3.2 Die Programmierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse durch perinatalen Stress und synthetische Glucocorticoide

Pränataler Stress ist im Stande, den negativen Feedback-Mechanismus der HHN-Achse im späteren Leben zu stören (Ladd et al. 2004). Ein relevanter Stressor ist wie schon beschrieben psychologischer Stress der Mutter. So konnte bei jungen adulten Nachkommen gesunder Mütter, die während der Schwangerschaft einschneidende Lebensereignisse (Tod eines Angehörigen, Scheidung, Autounfall) erfahren hatten, nach Durchlaufen einer standardisierten Stresssituation (Trier Social Stress Test) eine überschießende CORT-Antwort nachgewiesen werden (Entringer et al. 2009). Auch führte pränataler Stress und vermehrte

Ängstlichkeit der Mutter zu einem gestörten Verhalten der Kinder in der Adoleszenz im Sinne einer erhöhten Prävalenz von Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom und Depression und war assoziiert mit einem abgeflachten CORT-Tagesprofil (Van den Bergh et al. 2008). In Kenntnis der Tatsache, dass Stress bei Einwirkung während der Schwangerschaft zu einer nachhaltigen Störung des Feedback-Mechanismus der HHN-Achse führen kann, soll als nächstes darauf eingegangen werden, wie dieser von der Mutter auf den Fetus übertragen wird.

Da die fetale HHN-Achse beim Menschen bis in die späte Schwangerschaft hinein reift und die Aktivität der Stressachse des Fetus erst etwa eine Woche vor der Geburt in nennenswertem Maße ansteigt, reagiert er besonders empfindlich auf mütterliche Stresshormone (Kapoor et al. 2006). Man geht in diesem Zusammenhang davon aus, dass mütterliches CORT über die Plazenta Zugang zum fetalen Kreislauf hat (Gitau et al. 2001). Zwar existiert mit dem Enzym 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD2) eine Barriere zwischen maternalem und fetalem Blutkreislauf, die mütterliches CORT beim Übertritt in den fetalen Kreislauf zu über 90% inaktiviert (Beitins et al. 1973, Dormer und France 1973, Murphy 1977, Sun et al. 1999). Bei hohen CORT-Konzentrationen zeigt das Enzym jedoch einen Sättigungseffekt, wodurch in diesem Fall überproportional viel CORT in den fetalen Kreislauf übergeht (Staud et al. 2006). Potenzierend wirkt, dass pränataler Stress die Expression der 11 β -HSD2 vermindern und so auch auf diesem Weg zu höheren fetalen CORT-Spiegeln führen kann (Langley-Evans et al. 1996, Lesage et al. 2001, Bertram et al. 2001, Togher et al. 2014). Die Aktivität des Enzyms unterliegt zudem physiologischen Schwankungen im Verlauf der Schwangerschaft. Es konnte gezeigt werden, dass die 11 β -HSD2 beim Menschen zwischen der 19. und 26. Schwangerschaftswoche (in der Endphase der Neurogenese) in ihrer Aktivität vermindert ist, wohingegen der Umsatz des Enzyms später wieder zunimmt (Seckl und Meaney 2004). Dies geht mit der Erkenntnis konform, dass Stressreize eine umso größere Wirkung auf das Verhalten haben, je früher sie in der Schwangerschaft einwirken (Van den Bergh et al. 2008). Während körpereigene GC durch die plazentare 11 β -HSD2 inaktiviert werden, stellen sGC wie DM und BM hingegen keine geeigneten Substrate für das Enzym dar und treten ungehindert in den fetalen Kreislauf über (Brown et al. 1996). Dies wird im Rahmen der pränatalen GC-Therapie in der späten Schwangerschaft mit dem Ziel der Förderung der Lungenreifung durch sGC genutzt, birgt aber im Hinblick auf die Programmierung der HHN-Achse Nachteile. Nicht nur die fehlende Inaktivierung durch die Plazenta spielt bei der Wirkung von DM und BM auf

den fetalen Organismus eine Rolle. Sie besitzen im Vergleich zu CORT auch eine vielfach höhere Affinität für den GR, sind jedoch nur ein schlechter Ligand für MR (Kapoor et al. 2006). Eine tägliche pränatale Applikation von DM (0,1 mg/kg Körpergewicht) im letzten Schwangerschaftsdrittel war im Stande, bei Ratten die Expression von GR im Hippocampus bis ins Alter von sechs Monaten hinein herunter zu regulieren (Levitt et al. 1996, Welberg et al. 2001).

Auf molekularer Ebene lassen sich zwei Mechanismen ausmachen, mittels derer GC eine solche Programmierung der HHN-Achse bewirken (Fowden et al. 2016). Zum einen initiieren Liganden bei Bindung an den GR, welcher als Transkriptionsfaktor hormonrezeptive Abschnitte der DNA adressiert, die Genexpression von sich in Reifestadien befindlichen Organen oder Zellpopulationen (Harris und Seckl 2011, Fowden et al. 2016). Diese diskreten Veränderungen können Auswirkungen auf den Stoffwechsel von Zellen haben zum Beispiel in Form von zeitlebens vermehrtem oxidativen Stress (Fowden et al. 2016). Zum anderen wird fetale Programmierung durch pränatalen Stress über epigenetische Veränderungen vermittelt (Fowden et al. 2016). Die vermehrte Methylierung des GR-Promoters NR3C1 bewirkt demnach eine dauerhaft verminderte Expression des Rezeptors im späteren Leben und bietet damit eine mögliche Erklärung für die fetale Programmierung einer desensitvierten Stressachse und damit für zeitlebens erhöhte CORT-Spiegel, da - wie in Kapitel 2.3 beschrieben - der GR für den negativen Feedback-Mechanismus der HHN-Achse wichtig ist (Oberlander et al. 2008, Palmagudiel et al. 2015). Dies konnte an Neugeborenen von Müttern mit starkem psychosozialen Stress in Form von traumatischen Kriegserlebnissen und an Nachkommen zum Zeitpunkt der Schwangerschaft depressiver Frauen aufgezeigt werden (Kertes et al. 2016, Mulligan et al. 2012, Oberlander et al. 2008). Doch nicht nur suprphysiologische CORT-Konzentrationen, sondern auch eine pränatale GC-Therapie hat epigenetische Veränderungen zur Folge. So wurden im Nagermodell nach einer pränatalen Behandlung mit BM im letzten Trimenon im Hippocampus Veränderungen in Form von Hypermethylierung und -Acetylierung einer Vielzahl an GR-Promotern nachgewiesen, woraus die Autoren ableiteten, dass die programmierende Wirkung sGC maßgeblich epigenetisch vermittelt wird (Crudo et al. 2013a, Crudo et al. 2013b).

2.3.3 Vulnerable Phasen für eine perinatale Programmierung

Das Zeitfenster, in dem perinatale Stressreize einen programmierenden Effekt in der erläuterten Form haben, ist zwischen verschiedenen Spezies sehr variabel (Seckl 2004, Talge

et al. 2007). Im Nagermodell scheint es in Bezug auf die Entwicklung der HHN-Achse im letzten Drittel der Schwangerschaft zu liegen (Darnaudey und Maccari 2008, Muneoka et al. 1997, Shoener et al. 2006, Morley-Fletcher et al. 2003). Beim Menschen ist der Effekt von pränatalem Stress auf die Entwicklung der HHN-Achse wahrscheinlich in einer frühen Phase der Schwangerschaft höher (Weinstock 2008). Die unterschiedlichen vulnerablen Zeitfenster, welche zwischen Nagern und Säugern ermittelt wurden, sind dabei entscheidend auf den Reifegrad des Neugeborenen zurückzuführen (Seckl 2004). Während beim Menschen die Reifung der HHN-Achse mit der Geburt nahezu abgeschlossen ist, entwickelt sich diese beispielsweise bei Mäusen in entscheidendem Maße auch noch postnatal, indem die Expression von GR im Hippocampus in den ersten beiden Wochen nach der Geburt deutlich zunimmt (Dobbing und Sands 1979, Noorlander et al. 2006, Schmidt et al. 2003). Auch findet sich bei Mäusen und Ratten in den ersten beiden postnatalen Wochen eine Phase, in der ein äußerer Stressreiz eine (im Vergleich zum späteren Leben) schwächere Aktivierung der HHN-Achse zur Folge hatte (Levine 1994, Schmidt et al. 2003). Diese wird auch Stress-hypo-responsive Periode (SHRP) genannt und kennzeichnet sich neben einer verminderten CORT-Antwort auf kurzzeitigen Stress durch niedrige CORT-Basalspiegel aus (de Kloet et al. 2005b). Die Hyporesponsivität der HHN-Achse wird dabei maßgeblich durch einen vorübergehend verstärkten Feedback-Mechanismus der GR wahrscheinlich auf der Ebene der Hypophyse vermittelt (Cole et al. 1993, Schmidt et al. 2005, de Kloet et al. 2005a). Die dadurch während der ersten beiden Lebenswochen niedrigen CORT-Spiegel sollen eine störungsfreie Entwicklung insbesondere GC-sensitiver Hirnregionen wie des Hippocampus gewährleisten (Lajud et al. 2012, Sapolsky und Meaney 1986). Eine Isolation von der Mutter in dieser Phase der Entwicklung der Jungtiere bewirkte bei Ratten im Alter von 2 Monaten jedoch eine verstärkte Aktivität der HHN-Achse sowohl in Ruhe als auch in Antwort auf Stress (Biagini et al. 1998). Eine Überaktivität der Stressachse nach vorübergehender Separation von der Mutter während der Stress-hypo-responsiven Phase konnte auch noch bei zwei bis drei Monate alten Ratten nachgewiesen werden und war bei diesen mit einer verminderten GR-Dichte vergesellschaftet (Aisa et al. 2008).

Nachdem unter anderem mögliche Mechanismen erläutert wurden, mit denen pränataler Stress – aber im Nagermodell auch die Separation der Nachkommen vom Muttertier in einer frühen postnatalen Phase – eine in ihrer Funktion zeitlebens gestörte HHN-Achse

programmieren kann, soll im Folgenden auf sekundäre Folgen dieser Fehlregulation eingegangen werden.

2.4 Der Einfluss von perinatalem Stress und synthetischen Glucocorticoiden auf das Verhalten

Dauerhafte erhöhte CORT-Spiegel sind mit einer Reihe von psychiatrischen Erkrankungen assoziiert und umgekehrt finden sich insbesondere beim Krankheitsbild der Depression Hinweise für eine fehlregulierte Stressachse. So zeigten sich bei depressiven Patienten erhöhte Basalwerte für CORT, eine insuffiziente Suppression der Hormonachse im DM-Hemmtest (Carroll et al. 1976b, Carroll et al. 1976a, Carroll et al. 1980) sowie eine gesteigerte CRH-Produktion (Lopez-Duran et al. 2009, Owens und Nemeroff 1991). CORT hemmt Serotonin und führt möglicherweise so zu depressiven Symptomen (Maletic et al. 2007). Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Applikation von CRH im NagermodeLL zu vermehrtem depressiven Verhalten führte, wohingegen CRH-Antagonisten im Tierversuch antidepressiv und anxiolytisch wirkten (Owens und Nemeroff 1999, Holsboer und Ising 2008). Diese Substanzklasse könnte damit künftig Eingang in die Therapie der Depression finden.

Die Gabe von selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern hat reziprok Effekte auf Komponenten der HHN-Achse. Sertralin bewirkte im NagermodeLL eine gesteigerte Neurogenese im Hippocampus, indem es bei längerfristiger Anwendung (>2 Wochen) die Transkription GR-vermittelter Gene initiierte (Anacker et al. 2011a, Anacker et al. 2011b). Darüber hinaus führte das derselben Stoffklasse zuzuordnende Medikament Sertralin zu einer Normalisierung der im Modella einer Depression erhöhten hippocampalen CRH-Konzentration bei der Ratte (Fernandez Macedo et al. 2013).

In Übereinstimmung mit der beschriebenen Assoziation von erhöhten CORT-Spiegeln mit depressivem Verhalten bei depressiven Patienten scheint pränataler Stress, welcher eine verminderte negative Rückkopplung der HHN-Achse zur Folge haben kann (siehe Kapitel 2.3.2), beim Menschen für affektive Erkrankungen im späteren Leben zu prädisponieren (Kapoor et al. 2008). Dies konnte an Jugendlichen, deren Mütter während der Schwangerschaft unter vermehrter Ängstlichkeit litten, in Form einer erhöhten Prävalenz von Depressionen gezeigt werden (Van den Bergh et al. 2008). Auch Nachkommen von Müttern, die in der Schwangerschaft Opfer eines Erdbebens waren (Watson et al. 1999), den Tod eines nahen Angehörigen verkraften mussten (Khashan et al. 2011) oder unter Hunger litten (Brown

et al. 2000), entwickelten als Jugendliche und junge Erwachsene signifikant häufiger eine depressive Erkrankung. Die fetale Programmierung der affektiven Störung war in den genannten Studien übereinstimmend beim männlichen Geschlecht stärker ausgeprägt, wobei die Gründe hierfür noch weitgehend unklar sind (Khashan et al. 2011, Brown et al. 2000). Auch im Rattenmodell vermochte psychologischer Stress der Mutter depressive Verhaltensänderungen bei den zwei Monate alten Nachkommen auszulösen (Abe et al. 2007). Während beim Menschen eine erhöhte Vulnerabilität für affektive Störungen in Folge einer pränatalen GC-Therapie in prospektiven Studien noch nicht belegt ist, konnte bei drei Monate alten Ratten ein solcher Effekt der pränatalen Gabe von Dexamethason in Form eines vermehrt depressiven Verhaltens hingegen nachgewiesen werden (Roque et al. 2011).

Als Erklärung könnte herangezogen werden, dass in mehreren Versuchen an Nagern eine pränatale GC-Therapie bei den entsprechenden Nachkommen eine verminderte synaptische Konzentration von Serotonin und Noradrenalin in Neuronen des Hippocampus und des Hypothalamus nach sich zog und möglicherweise auf diese Weise für depressives Verhalten vermittelt (Muneoka et al. 1997, Peters 1982). Im Nagermodell konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass pränatale Stressreize, zum Beispiel Immobilitätsstress der Mutter in der späten Schwangerschaft, zu einer Degeneration des Hippocampus führen können (Belnoue et al. 2013, Gobinath et al. 2014, Rayen et al. 2011). Eine Atrophie dieser Hirnstruktur ist wiederum mit affektiven Störungen assoziiert (Sheline et al. 1996). So fanden sich bei depressiven Patienten strukturelle Veränderungen wie eine Reduktion der Dichte von Neuronen im Hippocampus, welche auch magnetresonanztomographisch in Form einer hippocampalen Volumenminderung nachweisbar waren (Palazidou 2012, Videbech und Ravnkilde 2004).

2.5 Der Einfluss von perinatalem Stress und synthetischen Glucocorticoiden auf die Immunantwort

Bei einer Hirnläsion nach einem ischämischen Schlaganfall spielt aus pathophysiologischer Sicht neben dem nekrotischen Zelltod, welcher Folge einer akuten und andauernden Perfusionsstörung ist, insbesondere die Schädigung durch Apoptose in dem Infarkt kern angrenzenden Gewebeanteilen, vor allem in der Penumbra, eine wichtige Rolle. Diese sekundäre Läsion ist wesentlich durch eine inflammatorische Antwort auf die Durchblutungsstörung vermittelt (Dirnagl et al. 1999). Die Hypoxie und der Anstieg von freien Radikalen im Gewebe führen zur Expression von proinflammatorischen Genen, welche die

Bildung von Entzündungsmediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und Interleukin 1 β (IL-1 β) in Neuronen und Mikroglia induzieren (Wang et al. 2007). Diese regen die Einwanderung von Neutrophilen, Makrophagen und Monozyten an (Dirnagl et al. 1999). Nach der ersten, rein ischämischen Gewebläsion folgt demnach eine zweite, entzündlich vermittelte Schädigung. Deren zeitliche und räumliche Begrenzung wird maßgeblich durch die Ausschüttung von CORT vermittelt. So führt IL-1 β zur Sekretion von CRH im Hypothalamus (Sapolsky et al. 2000). Die damit aktivierte HHN-Achse schüttet letztlich CORT aus, was wiederum zu einer Verminderung von Synthese und Wirksamkeit proinflammatorischer Zytokine führt (Sapolsky et al. 2000). Dies spricht für eine enge Verwobenheit von Stressachse und Immunsystem. Es lässt sich ableiten, dass pränataler Stress über eine Fehlregulation der Stressantwort einen (sekundären) Einfluss auf die Entzündungsreaktion haben könnte. So hatte im Rattenmodell pränataler Immobilitätsstress in der letzten Woche der Schwangerschaft eine stärkere Entzündungsreaktion nach Gabe des Endotoxins Lipopolysaccharid sowie eine stärkere Sekretion proinflammatorischer Zytokine zur Folge. Vorstellbar ist, dass eine durch pränatale Programmierung einer hyperresponsiven HHN-Achse modulierte inflammatorische Antwort vor allem in der Penumbra die sekundären Schäden verursacht und dadurch die Entzündungsreaktion und damit einhergehenden, sekundären Gewebsschäden nach zerebraler Ischämie verstärken kann (Ouyang 2013, Craft und Devries 2009, Lindsberg und Grau 2003, Lakhani et al. 2009).

Die pränatale Programmierung einer desensitivierten HHN-Achse scheint jedoch nicht nur in Bezug auf die dadurch veränderte Entzündungsreaktion negative Folgen im Hinblick auf eine zerebrale Ischämie zu haben. Es gibt darüber hinaus Hinweise darauf, dass auch eine durch pränatalen Stress veränderte Gefäßfunktion die Vulnerabilität für kardiovaskuläre Erkrankungen beeinflussen könnte.

2.6 Der Einfluss von perinatalem Stress und synthetischen Glucocorticoiden auf die Gefäßfunktion

Pränataler Stress kann die Funktion des kardiovaskulären Systems über eine veränderte Aktivität der HHN-Achse beeinflussen. Eine Stressreaktion, zum Beispiel im Rahmen einer zerebralen Ischämie, geht physiologisch kurzfristig stets mit einer Vasokonstriktion und einem erhöhten systemischen Blutdruck einher, was die Bedeutung einer Aktivierung der Stressachse in der Regulation des Blutdrucks unterstreicht. Die (anhaltende) arterielle

Hypertonie ist wiederum einer der wichtigsten Risikofaktoren für ischämische Schlaganfälle (Meschia et al. 2014). Zwar scheint eine hyperresponsive Stressachse in Folge von pränatalem Stress die Entwicklung einer Hypertonie zu begünstigen und somit die Vulnerabilität für kardiovaskuläre Ereignisse zu erhöhen (Craft und Devries 2009). Der programmierende Effekt von pränatalem Stress auf den postnatalen Blutdruck ist jedoch nicht übereinstimmend belegt. Fand sich einerseits im Rahmen einer prospektiven Studie nach pränataler BM-Gabe bei 30-jährigen Probanden keine Abweichung in Bezug auf den Blutdruck (Dalziel et al. 2005), so konnte andererseits bei Jugendlichen, die wegen drohender Frühgeburt ebenfalls eine pränatale Therapie mit BM zur Lungenreifung erhalten hatten, im Alter von 14 Jahren ein erhöhter Blutdruck konstatiert werden (Doyle et al. 2000).

Im Nagerversuch fand sich bei vier Monate alten Ratten ebenfalls ein erhöhter Blutdruck in Folge pränatalen Stress [Immobilitätsstress der Mutter in der letzten Schwangerschaftswoche (Igosheva et al. 2007)]. Diese Beobachtung bestätigt sich im Modell des fetalen Schafs, bei dem die Stressachse analog zum Menschen im letzten Trimenon reift und das sich deshalb als Modell für die menschliche fetale Entwicklung eignet. Die pränatale Gabe von DM in der frühen Schwangerschaft (Zeitpunkt 0.2 Gestation) hatte einen erhöhten Blutdruck bei den vier Monate alten Nachkommen zur Folge (Dodic et al. 1998). Der Effekt war bei den Tieren auch noch im Alter von sieben Jahren nachweisbar (Dodic et al. 2002b). Da zu diesem Zeitpunkt jedoch keine veränderte Expression von MR und GR in Hypothalamus und Hippocampus nachweisbar war, hielten die Autoren eine Fehlregulation der HHN-Achse als Ursache für die Programmierung der Hypertonie für unwahrscheinlich und zogen eine Modulation des vegetativen Nervensystems in Betracht (Dodic et al. 2002a).

Die Aktivierung des Sympathikus führt physiologisch zu einer Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes und trägt somit zur Blutdruckregulation bei. Pränataler Stress kann eine Steigerung des Sympathikotonus zur Folge haben und so für eine arterielle Hypertonie prädisponieren (Alexander et al. 2015, Young 2002). Anhaltender Bluthochdruck war auch in klinischen Studien mit einer verstärkten Aktivierung des sympathischen Nervensystems assoziiert (Dogru et al. 2010).

Neben einem erhöhten Vasotonus durch die vermehrte Aktivierung der HHN-Achse und des Sympathikus kann auch die Aktivität wichtiger Vasomediators durch pränatale Programmierung moduliert werden (Anwar et al. 2016). Die Dysbalance zwischen gefäßerweiternden und -verengenden Botenstoffen wird auch als endotheliale Dysfunktion

bezeichnet. Wesentliche Vasokonstriktoren, die einer pränatalen Programmierung unterliegen können, sind beispielsweise Thromboxan A₂ (TX) und Endothelin 1 (ET 1). So hat die DM-Gabe in der späten Schwangerschaft im Schafmodell bei den fünf Monate alten Nachkommen eine Erhöhung der Sensitivität auf ET 1 und damit einen größeren peripheren Gefäßwiderstand zur Folge (Molnar et al. 2003). Im Gegensatz hierzu war ebenfalls im Schafmodell nach einer DM-Gabe in der frühen Schwangerschaft eine verstärkte vasokonstriktorische Antwort auf TX vor allem in den Koronargefäßen und den Karotiden nachweisbar (Roghair et al. 2005a, Roghair et al. 2005b). Den gefäßverengenden Mediatoren gegenübergestellt gilt Stickstoffmonoxid (NO) als der bedeutendste Vasodilatator des Endothels. Auch seine Funktion kann von pränataler Programmierung adressiert werden. So vermindern pränatal applizierte sGC über eine Herunterregulierung der Expression des Enzyms endogene NO-Synthase zeitlebens die Bioverfügbarkeit von NO und führen damit zu einer eingeschränkten Vasodilatation, was einen erhöhten Gefäßtonus zur Folge hat (Anwar et al. 2016).

Die in den beiden vorangegangenen Abschnitten erläuterten pränatalen Programmierungsvorgänge der Entzündungsreaktion und der Gefäßfunktion bieten letztlich Erklärungsmodelle für die Beobachtung, dass pränataler Stress nicht nur mit psychiatrischen Erkrankungen wie der Depression assoziiert ist, sondern auch zu einer erhöhten Prädisposition für kardiovaskuläre Erkrankungen führen kann. Das Krankheitsbild des ischämischen Schlaganfalls ist im Hinblick auf seine pränatale Programmierung zwar noch nicht gut untersucht. Die dargestellten Programmierungsvorgänge sind jedoch wahrscheinlich auch hier von Bedeutung und potenziell anwendbar.

2.7 Epidemiologische und pathophysiologische Zusammenhänge zwischen Schlaganfall und Depression

Interessanterweise bieten sich eine Reihe pathophysiologischer Berührungspunkte zwischen dem Krankheitsbild Schlaganfall und affektiven Störungen. So fanden sich bei depressiven Patienten Hinweise für eine endotheliale Dysfunktion und es konnte bei diesem Patientengut unabhängig von Risikofaktoren wie Alter, arterielle Hypertonie, Arteriosklerose oder Diabetes Mellitus ein erhöhtes Schlaganfallrisiko nachgewiesen werden (Dong et al. 2012, Salaycik et al. 2007, de Castro et al. 2008). Die endotheliale Dysfunktion konnte bei jungen, an einer Depression erkrankten Frauen in Form einer verminderten NO-vermittelten Vasodilatation

gezeigt werden (Tomfohr et al. 2008). Die veränderte Gefäßfunktion bei depressiven Patienten ist demnach ein denkbarer Grund für das erhöhte kardiovaskuläre Risiko im Rahmen affektiver Störungen.

Umgekehrt entwickelt etwa jeder dritte Patient innerhalb von fünf Jahren nach einem Schlaganfall depressive Symptome (Robinson und Jorge 2016). Ging man vor Jahrzehnten noch von einer unvermeidlichen psychologischen Reaktion auf die körperliche Behinderung in Folge der Hirnläsion aus, so finden heute neurobiologische Aspekte zunehmend Eingang in das Verständnis der Pathophysiologie der Post-Stroke-Depression (PSD). Zum einen waren unter anderem links-hemisphärielle Läsionen des präfrontalen Cortex, dessen Bedeutung im Hinblick auf die Entstehung affektiver Erkrankungen zwar erkannt, aber noch nicht vollständig verstanden ist, signifikant häufiger mit einer Depression in den ersten drei Monaten nach Infarkt assoziiert (Morris et al. 1996, Shimoda und Robinson 1999, Koenigs und Grafman 2009).

Zum anderen spielt unabhängig von läsionsspezifischen Folgen die Entzündungsreaktion, welche durch den Schlaganfall in Gang gesetzt wird, eine wichtige Rolle (siehe auch Kapitel 2.5). Proinflammatorische Zytokine wie $IL\ 1\beta$ und $TNF\alpha$, welche im Rahmen der Immunantwort ausgeschüttet werden, waren auch bei depressiven Patienten erhöht nachweisbar (Tuglu et al. 2003, Anisman et al. 1999, Levine et al. 1999). Beide Mediatoren können den Umsatz von Neurotransmittern wie Serotonin und Noradrenalin beschleunigen und damit deren synaptische Konzentration in Strukturen des limbischen Systems vermindern, woraus sich ein weiterer pathogenetischer Erklärungsansatz für die Depression ergibt (Spalletta et al. 2006). Im Sinne eines sich selbst verstärkenden Systems aktiviert die proinflammatorische Kaskade die HPA-Achse (Maes et al. 1993). So fand man auch in epidemiologischen Studien bei depressiven Patienten – wie in Kapitel 2.4 beschrieben – häufig eine hyperresponsive Stressachse (Holsboer 2001).

3 ZIELE DER ARBEIT

Wie in der Einleitung erläutert kann vorgeburtlicher Stress Auswirkungen auf die Reifung verschiedener Organsysteme des Fetus haben, deren Folgen bis ins Erwachsenenalter hineinreichen. Dies kann bei den Nachkommen unter anderem eine höhere Inzidenz von affektiven Störungen und kardiovaskuläre Erkrankungen zur Folge haben. Während die Effekte beispielsweise auf Blutdruck, Glucoseintoleranz und Herzerkrankungen in retrospektiven, epidemiologischen Studien am Menschen sowie im Tierexperiment gut untersucht sind (Alexander et al. 2015, Dalziel et al. 2005), ist das Wissen um die Einflüsse von vorgeburtlichem Stress und insbesondere einer pränatalen Glucocorticoid-Therapie auf die Vulnerabilität für Schlaganfälle noch lückenhaft. Vor allem, in welchem Maße sich eine durch pränatalen Stress vermittelte Fehlregulation der Stresshormonachse letztlich auf die Größe eines Schlaganfalls und das resultierende motorische Defizit nach zerebraler Ischämie auswirkt, ist bislang nicht hinreichend untersucht (Craft und Devries 2009). Auch die Studienlage hinsichtlich der Frage, ob eine fetale Programmierung der HHN-Achse die Prädisposition für eine Depression im späteren Leben erhöhen könnte, ist nicht eindeutig. Im Kontext tierexperimenteller Studien zur Untersuchung von perinatalem Stress wurde im Vorfeld nur selten (wie in den vorliegenden Untersuchungen) ein ähnliches experimentelles Protokoll für Individuen beider Geschlechter angewandt, sodass hinsichtlich der gleichen Fragestellung Aussagen über Individuen verschiedener Geschlechter getroffen werden konnten. Dies ist von Bedeutung, weil Stressempfindlichkeit, insbesondere in Bezug auf die Programmierung des Verhaltens, häufig geschlechtsspezifische Merkmale aufweist (Weinstock 2007). Die klinische Relevanz der Untersuchung von Auswirkungen pränataler Stressreize wie einer pränatalen Glucocorticoid-Therapie ergibt sich in erster Linie aus der Tatsache, dass in Deutschland etwa jedes zehnte Kind zu früh auf die Welt kommt (AQUA 2016). Die drohende Frühgeburt macht dabei häufig eine pränatale Therapie mit Glucocorticoiden zur Förderung der Lungenreifung notwendig. Wir untersuchten deren Effekte am Mausmodell, einem etablierten Modell in der Schlaganfallforschung. Um eine Vergleichbarkeit hinsichtlich der Auswirkungen einer pränatalen GC-Therapie bei der Maus mit einer solchen Behandlung beim Menschen zu erlauben, wurde die Behandlung bei den Tieren in diesem Versuch analog zur leitliniengerechten Anwendung bei drohender Frühgeburt zum einen im letzten Schwangerschaftsdrittel und zum anderen mit der beim

Menschen in der klinischen Praxis angewandten, körperrgewichtsadaptierten Dosis Dexamethason durchgeführt.

Hieraus leiten sich die folgenden Arbeitshypothesen ab:

1. Eine pränatale GC-Therapie und die postnatale Mutterseparation führen geschlechtsunabhängig zu einem höheren Maß an depressivem Verhalten im späteren Leben.
2. Eine pränatale GC-Therapie und die postnatale Mutterseparation führen geschlechtsunabhängig zu einem größeren Schlaganfallvolumen mit schlechterem funktionellen Outcome.
3. Diese Veränderungen korrelieren geschlechtsunabhängig mit einer hyperresponsiven HHN-Achse.

Zur Prüfung dieser Hypothesen wurde ein Teil der Versuchstiere mit einer pränatalen GC-Therapie behandelt. Um spezifische Effekte einer pränatalen GC-Gabe von denen psychologischer Stressoren unterscheiden zu können, wurde ein anderer Teil der Mäuse in den ersten beiden postnatalen Wochen jeweils mehrere Stunden pro Tag von der Mutter separiert. Mäuse bringen im Vergleich zum Menschen vergleichsweise unreife Nachkommen zur Welt (Dobbing und Sands 1979). Das zentrale Nervensystem ist vor allem in den ersten zwei Wochen nach der Geburt, die physiologisch von einer hyporesponsiven Stressachse geprägt sind, noch in Reifung begriffen (Lajud et al. 2012, Schmidt et al. 2005). Eine zeitweise Trennung vom Muttertier kann in dieser Phase ähnlich wie pränataler Stress eine Überaktivität der HHN-Achse im späteren Leben programmieren (Lajud et al. 2012, Schmidt et al. 2005). Um die Effekte einer pränatalen GC-Therapie und die einer Mutterseparation auf die Entwicklung der Stressachse und die Vulnerabilität für Schlaganfall und Depression zu untersuchen, wurden die Versuchstiere einem experimentellen Protokoll unterzogen, das es uns erlaubte, mit am Nagerrmodell etablierten Methoden das Verhalten der Tiere und die Aktivität der HHN-Achse zu beurteilen sowie das funktionelle Outcome nach induziertem Schlaganfall und dessen Größe zu quantifizieren.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Übersicht des Versuchsablaufes

Alle Versuche erfolgten nach Genehmigung des Thüringer Landesamtes für Verbraucherschutz, Abteilung Tierschutz. Zur Untersuchung des Einflusses von perinatalem Stress wurden insgesamt 86 Mäuse beider Geschlechter der Rasse C57/Bl6 entweder perinatal keinem Stressreiz ausgesetzt (Kontrollgruppe k), pränatal mit GC behandelt (Gruppe GC [E16/17]) oder in den ersten beiden postnatalen Wochen vom Muttertier separiert (Gruppe MS, siehe Kapitel 4.2). Um den Einfluss der weiblichen Sexualhormone auf die nachfolgenden Versuche zu minimieren, erfolgte eine Synchronisation des Ovarialzyklus auf einander ähnliche Zyklusphasen (siehe Kapitel 4.3). Die Aktivität der HHN-Achse wurde anhand der CORT-Stressantwort auf zwanzigminütigen Immobilitätsstress bestimmt (siehe Kapitel 4.4). Depressives Verhalten wurde über die Dauer der Immobilität im Schwanzhalteversuch quantifiziert (siehe Kapitel 4.5). Der Schlaganfall wurde durch Okklusion der A. cerebri media (MCAO) herbeigeführt (siehe Kapitel 4.6). Das Niveau der motorischen Beeinträchtigung nach dem Schlaganfall (Schlaganfall-Outcome) wurde anhand verschiedener motorischer Tests ermittelt (siehe Kapitel 4.7). Sieben Tage nach MCAO wurden die Gehirne entnommen, histologische Schnitte angefertigt und gefärbt sowie anschließend das Schlaganfallausmaß histologisch volumetrisch bestimmt (siehe Kapitel 4.8). Sowohl der Schwanzhalteversuch als auch die motorischen Tests wurden von ein und demselben Untersucher durchgeführt. In Abbildung 1 ist das experimentelle Protokoll vereinfacht als Zeitstrahl dargestellt.

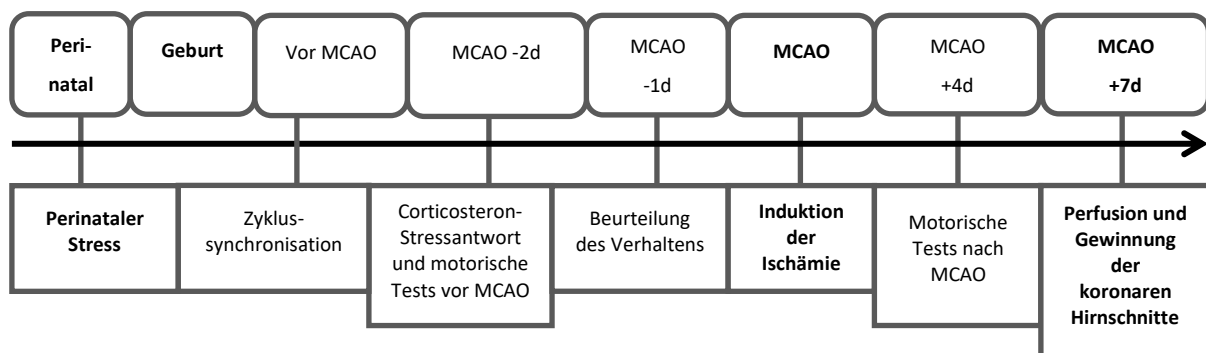


Abbildung 1: Zeitstrahl des experimentellen Protokolls. Bei Tieren aus der Kontrollgruppe entfiel der perinatale Stressreiz und bei den männlichen Tieren die Zyklussynchronisation.

Abbildung 2 zeigt die Zusammenstellung der Gruppen. Zum Zeitpunkt des Schlaganfalls waren die Tiere im arithmetischen Mittel 7,6 ($\pm 2,2$) Monate alt.

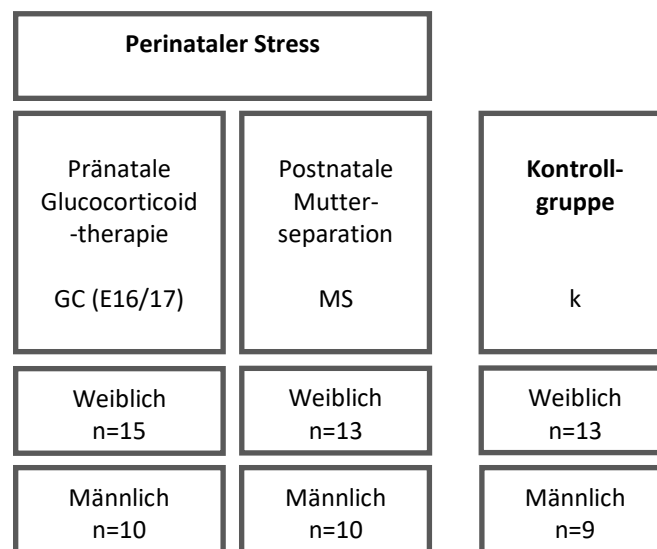


Abbildung 2: Aufteilung der Gruppen unter Angabe der Stichprobengröße.

4.2 Perinatale Glucocorticoid – oder Stressexposition

Die Applikation der perinatalen Stressreize wurde von Mitarbeitern der Serviceeinheit Kleinnager am Forschungszentrum Lobeda des Universitätsklinikums Jena durchgeführt.

Glucocorticoid-Therapie

Als Medikament zur Behandlung der Muttertiere wurde Dexamethason (Präparat Fortecortin, Firma Merck Serono, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Anwendung des Arzneimittels in der klinisch üblichen Dosierung (2x 12 mg an zwei aufeinanderfolgenden Tagen) wurde ein Körpergewicht der menschlichen Mutter von 70 kg angenommen und davon ausgehend eine gewichtsadaptierte Dosis von DM von 0,17 mg/kg Körpergewicht für die Versuchstiere errechnet. An den Tagen 16 und 17 der Gestation (im Folgenden E16/17) wurde dem entsprechenden Muttertier die errechnete Dosis des Medikamentes intraperitoneal injiziert.

Mutterseparation

In einer anderen Gruppe erfolgte postnatal ein nicht-pharmakologischer Stressreiz in Form einer Separation der Mäusesäuglinge von der Mutter an den Tagen vier bis 14 (P4-14) nach der Geburt. Dafür wurden die Jungtiere für jeweils drei Stunden pro Tag von der Mutter getrennt in einem Inkubator gehalten und dann wieder in ihren Heimatkäfig zurückgesetzt. Während dieser Zeit waren Umgebungsfaktoren wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit ähnlich den physiologischen Umweltbedingungen, doch fehlte der soziale Kontakt zur Mutter. In

Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe wurde die tägliche Dauer von drei Stunden ermittelt, da sie kurz genug war, um eine problemlose Wiederannahme der Mäusenachkommen durch die Mutter zu gewährleisten, jedoch hinreichend lang, um einen adäquaten Stressreiz darstellen zu können.

4.3 Zyklussynchronisation

Dem weiblichen Geschlechtshormon Estradiol wird ein neuroprotektiver Effekt zugeschrieben (Wise et al. 2001, Carswell et al. 2000a). Dieser stellt einen wichtigen Störfaktor in der Schlaganfallforschung dar. So konnte bei Ratten innerhalb des Ovulationszyklus im Metestrus, der durch einen niedrigen Estradiol-Spiegel gekennzeichnet ist, ein signifikant größerer Hirninfarkt im Modell einer experimentell induzierten fokalen Ischämie nachgewiesen werden als unter ansteigenden Estradiol-Konzentrationen im Diestrus und Proestrus (Carswell et al. 2000b). Um den Einfluss des weiblichen Ovulationszyklus auf die Größe des Schlaganfalls gering zu halten, wurden die Weibchen im Vorfeld der Versuche durch Anwendung von Männchenstreu im Heimatkäfig auf einander ähnliche Zyklusphasen synchronisiert (Whitten 1958, Carswell et al. 2000b). Die Zyklusphase wurde per Vaginalabstrich am Tag der MCAO und anschließender mikroskopischer Beurteilung in Kooperation mit Gisela Nothaft (Gynäkologische Zytologie, Hospital zum heiligen Geist, Frankfurt) bestimmt. Als Zielphasen der Synchronisation wurden Proestrus und Estrus definiert. Zwar sinkt die Estradiol-Konzentration während des Eisprungs im zeitlichen Verlauf bereits wieder. Jedoch tritt die veränderte Zytologie in Folge der Dynamik des Hormonstatus mit einer zeitlichen Verzögerung ein. Aus diesem Grund können während dieser beiden Zyklusphasen ähnlich hohe Estradiol-Spiegel angenommen werden.

4.4 Corticosteron-Stressantwort

Um die Antwort der HHN-Achse auf einen kurzzeitigen Immobilitätsstress und damit die Aktivität der HHN-Achse zu beurteilen, wurde den Versuchstieren zu drei definierten Zeitpunkten (in Ruhe, unmittelbar nach Stress und 90 Minuten später) Blut entnommen und die jeweilige Serum-Konzentration von CORT bestimmt.

Mit der ersten Entnahme in Ruhe wurde der CORT-Basalwert generiert. Danach wurde jedes Tier in einen Restrainer (Durchmesser 3 cm, Länge 10 cm; runde Luftlöcher mit Durchmesser 5 mm, Eigenbau) verbracht. Durch Verschiebung eines Kunststoffzylinders im Restrainer konnte dessen Länge so angepasst werden, dass das Tier in seiner Bewegung stark eingeschränkt war und es auf diese Weise für die Zeitdauer von 20 Minuten einem Immobilitätsstress ausgesetzt wurde. Die zweite Blutentnahme unmittelbar nach Befreien des Tieres aus dem Restrainer bildete den Peak-Wert und dokumentierte den CORT-Anstieg im Blut im Rahmen der Stressreaktion. 90 Minuten nach dem Basalwert wurde mit der letzten Blutentnahme der Abklingwert generiert, der die im Rahmen der abklingenden Stressreaktion fallende CORT-Konzentration abbildete. In der Zeit zwischen zweiter und dritter Blutentnahme waren akustische oder mechanische Stressreize zu vermeiden. So konnte bei allen untersuchten Tieren sichergestellt werden, dass der Abklingwert tatsächlich niedriger war als der zugeordnete Peak-Wert. Nach erfolgreicher Blutentnahme wurde die entsprechende Kapillare in eine Monovette entleert, beschriftet und auf Eis gelagert. Innerhalb von maximal 90 min nach der jeweiligen Entnahme wurden die Proben zentrifugiert, abesert und bis zur laborchemischen Analyse bei -80 °C gelagert.

Alle Blutentnahmen wurden unter Narkose vorgenommen, die in einem Äthertopf mit wenigen Tropfen flüssigen Isoflurans (Isofluran, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) auf einem Einmal-Papierhandtuch eingeleitet wurde. Sobald das Tier schlief, wurde es auf die Arbeitsfläche auf eine mit Vlies bedeckte Heizmatte (Temperatur 37 °C) verbracht und die Narkose mit einem Gasgemisch aus 2% Isofluran (Isofluran, Baxter) sowie Distickstoffmonoxid und Sauerstoff im Verhältnis 20:60 über eine Maske fortgeführt. Die Blutentnahme erfolgte mit einer Glaskapillare aus dem retrobulbären Venenplexus. Um die CORT-Werte nicht durch einen Blutentnahmestress zu verfälschen, sollte die Zeitdauer der Blutentnahme drei Minuten nicht überschreiten. Das Volumen des entnommenen Blutes betrug pro Entnahme maximal 100 µl mit dem Ziel, eine Hypovolämie zu vermeiden. Zur zusätzlichen Vorbeugung dieser

wurde dem jeweiligen Tier nach der letzten Blutentnahme 1 ml Natriumchlorid-Lösung 0,9 % intraperitoneal injiziert.

Die Bestimmung der CORT-Konzentration im Serum wurde durch Mitarbeiter des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Jena vorgenommen. Die tiefgefrorenen Proben wurde mit einem Iod¹²⁵-Radioimmunoassay (Corticosterone Double Antibody RIA Kit, MP Biomedicals Germany, Eschwege, Deutschland) analysiert. Dieselbe Probe wurde einer Doppelmessung unterzogen und der Mittelwert beider Resultate bestimmt. Dieser Mittelwert wurde zur Auswertung herangezogen.

Insgesamt durchliefen die Versuche zur Corticosteron-Stressantwort 28 männliche und 40 weibliche Tiere. Vier Tiere wurden ausgeschlossen, da mindestens eine Blutentnahme nicht gelang, zu wenig Material für die laborchemische Untersuchung gewonnen wurde oder die Blutprobe hämolytisch war. Weitere fünf Tiere wurden aufgrund Protokollverletzungen ausgeschlossen (z. B. Dauer der Blutentnahme länger als drei Minuten oder Nichtgewährleistung der geforderten Stressfreiheit in der Zeit zwischen erster und zweiter Blutentnahme).

Aus den drei Blutentnahmen ergaben sich neben Basal-, Peak- und Abklingwert auch die Parameter Peak-Anstieg (Differenz aus Peak- und Basalwert) und Peak-Abfall (Differenz aus Peak- und Abklingwert). Sie erlaubten Aufschlüsse darüber, inwieweit die Tiere beispielsweise überschießende oder verzögert abklingende Stressreaktionen zeigten. Die Aktivität der HHN-Achse wurde anhand der in Abbildung 3 gezeigten Fläche unter der Kurve (Area under the Curve, AUC) bestimmt. Um den individuellen Stresslevel der Tiere bei der ersten Blutentnahme herauszurechnen, wurde die gesamte AUC (gestreifte Fläche) auf den Basalwert normiert und so der Parameter AUC-Antwort (gepunktete Fläche) berechnet. Die AUC-Antwort wurde in der Auswertung als Zielgröße für die Aktivität der HHN-Achse herangezogen. Sie charakterisiert die Reaktivität von Hormonsystemen wie der HHN-Achse besser als die auf den Nullpunkt normierte AUC, die eher Aufschluss über die Gesamthormonausschüttung einer Hormonachse gibt (Pruessner et al. 2003). Letztlich weist die AUC-Antwort auch eine geringere Streuung auf, da letztere maßgeblich durch den Basalwert bestimmt wird (Pruessner et al. 2003).

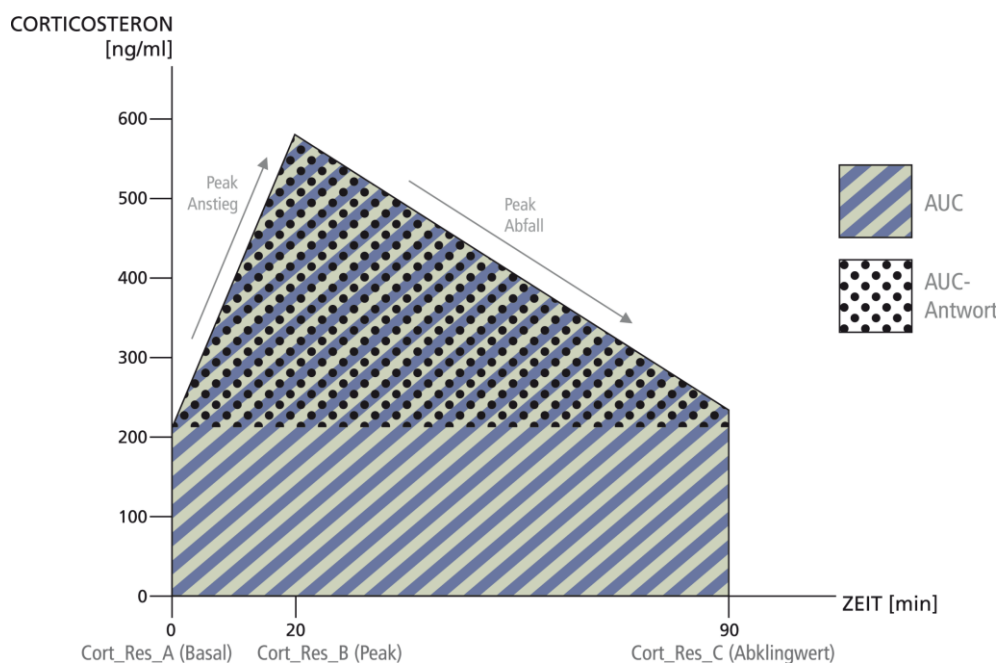


Abbildung 3: Darstellung der Parameter CORT-Basal-, -Peak- und -Abklingwert sowie Peak-Anstieg (Differenz [Peak - Basal]), Peak-Abfall (Differenz [Peak – Abklingwert]). Die Aktivität der Stressachse wurde anhand der Fläche unter der Kurve (AUC) berechnet. Der für die Auswertung herangezogene Parameter war die Fläche unter der Kurve, normiert auf den Basalwert (AUC-Antwort).

4.5 Beurteilung des Verhaltens

Das Ausmaß depressiven Verhaltens wurde mit dem Schwanzhalteversuch beurteilt (van der Heyden et al. 1987). Der Versuch wurde pro Tier einmal vor der MCAO durchgeführt. Ursprünglich wurde er ähnlich dem Forced Swimming Test angewendet, um die Wirkung von Antidepressiva in präklinischen Studien zu testen (Steru et al. 1985, Porsolt et al. 1977). Analog zum Forced Swimming Test reagierten Tiere im Schwanzhalteversuch auf den Stressstimulus einer Gefahrensituation ohne Fluchtmöglichkeit entweder mit motorischer Erregung oder mit Immobilität (Cryan et al. 2005). Das zweitgenannte Verhalten ist ein Indikator für Depression und wurde im hier geschilderten Versuchsaufbau genutzt, um die Versuchstiere hinsichtlich dieser Eigenschaft zu charakterisieren.

Der Schwanzhalteversuch war schnell durchzuführen, valide reproduzierbar und bedurfte wenig materieller Ressourcen. Benötigt wurden ein standsicheres Stativ aus massivem Edelstahl (Höhe 50 cm), Fixierpflaster (Breite 3 cm) und ein Tierkäfig mit frischer Streu. Der Schwanz des Versuchstieres wurde in 3 cm seines Verlaufes (entsprechend der Breite des Pflasters) mit dem Pflaster am Stativ fixiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Haut am Schwanz keinen direkten Kontakt mit der Oberfläche des Stativs hatte, um eine thermische Irritation des Tieres durch den kalten Stahl zu vermeiden. Zum Käfigboden nach unten wurde ein Abstand von 15 cm eingehalten. Der Schwanz musste mindestens 3 cm frei hängen, um ein seitliches Hochziehen der Maus auf das Stativ zu verhindern. Nachdem die Maus in ihrer Position, die es ihr also weder erlauben durfte, mit den Vorderläufen den Boden zu erreichen, noch nach oben auf das Stativ zu klettern, fixiert worden war, wurde eine Stoppuhr mit einem Countdown von 8 min gestartet (Uhr 1). Eine zweite Stoppuhr diente der Zeitnahme der Inaktivität des Versuchstieres (Uhr 2). Beide Uhren wurden zum Schallschutz unterhalb der Tischebene positioniert. Innerhalb der 8 min Gesamtversuchszeit wurde die Zeitdauer der Inaktivität des Tieres registriert. Dies waren jene Phasen, in denen keine Fluchtbewegungen (seitliches Hochziehen oder Laufbewegungen beziehungsweise „Lufttreten“) zu verzeichnen waren.

Die Inaktivität wurde in Abschnitten von 5 s Abschnitten gemessen, wobei pro 5 s Inaktivität ein Inaktivitätspunkt (IA) vergeben wurde (Tabelle 1). Die Inaktivitätspunkte wurden addiert und die errechnete Summe diente als Maß für depressives Verhalten des jeweiligen Tieres.

Zeitdauer der Inaktivität	Inaktivitätspunkte (IA)
<5 s	0 IA
>5 s bis 10 s	1 IA
>10 s bis 15 s	2 IA
>15 s bis 20 s	3 IA
>20 s bis 25 s	4 IA
>25 s	5 + x IA

Tabelle 1: Quantifizierung der Inaktivität im Schwanzhalteversuch

Fiel das Tier im Laufe des Versuches vom Stativ in den Käfig, so wurde Uhr 1 gestoppt und das Tier wieder fixiert. Die Zeitnahme lief erst weiter, wenn das Tier eine zum Versuchsbeginn vergleichbare Position innehatte. Das Herunterfallen des Tieres wurde entsprechend im Protokoll vermerkt. Hatte ein Tier Kot oder Urin abgesondert, so wurde ein neuer Käfig mit frischer Streu untergesetzt.

Mit dem beschriebenen Testverfahren wurden insgesamt 137 Mäuse untersucht. In die Auswertung des Schwanzhalteversuches gingen neben den Mäusen, die diesem Verhaltenstest im Rahmen des experimentellen Protokolls zum Schlaganfall (siehe 4.1) unterzogen wurden, auch 19 weibliche und 40 männliche Tiere ein, die zu anderer Zeit separat unter vergleichbaren Bedingungen getestet worden waren. Alle Versuchstiere waren zum Messzeitpunkt zwischen 4 und 9 Monate alt. Es wurden alle Tiere von der Auswertung ausgeschlossen, die sich während des Versuches von der Vorrichtung lösten und nicht innerhalb 30 Sekunden wieder angebracht werden konnten.

4.6 Schlaganfallinduktion durch MCAO

Der MCAO-Eingriff wurde von in der Methode erfahrenen medizinisch-technischen Assistentinnen unserer Arbeitsgruppe durchgeführt, um reproduzierbare Infarkte zu erzielen. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit einem Gemisch aus den Gasen Isofluran 3% (Isofluran, Baxter) und Lachgas über eine Nasenmaske. Die Narkose wurde nachfolgend mit 1,5% Isofluran (Isofluran, Baxter) aufrechterhalten. In Narkose wurde die Maus auf einer mit Vlies bedeckten, auf 37 °C geheizten Decke in Rückenlage am Untergrund fixiert, die Halshaut

rasiert, ein Hautschnitt median durchgeführt und das Bindegewebe eingeschnitten und stumpf aufgetrennt. Sodann wurde die A. carotis communis dargestellt und sanft vom Nervus vagus gelöst. Das Gefäß wurde zweimal mit einem dünnen Faden (Perma-Hand-Seide, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) umschlungen. Die Arterie wurde bis distal der Carotis-Bifurkation unter weiterer Lösung des Nervus vagus verfolgt. Dann wurde der Abgang der A. carotis externa dargestellt und mit einem Faden ligiert (Perma-Hand-Seide, Ethicon). Dann wurde eine Gefäßklemme auf der Carotis-Bifurkation angesetzt und die proximale Gefäßschlinge festgezogen. Die eigentliche Okklusion erfolgte mittels eines vorbereiteten silikonbeschichteten Fadens (Medium MCAO suture, Doccol, Sharon, USA). Hierzu wurde die A. carotis communis inzidiert und der silikonbeschichtete Faden 10 bis 11 mm unter Lösung der Klemme auf der Bifurkation über die A. carotis interna (ACI) bis in die A. cerebri media (MCA) vorgeschoben. Der Faden wurde daraufhin per Gefäßclip fixiert, die Wunde vernäht und die Narkose ausgeleitet.

Nach einer Okklusionszeit von 30 min wurde das Tier wie oben beschrieben erneut narkotisiert, der Faden aus der ACI entfernt, diese ligiert und die Wunde mittels Hautnaht verschlossen. Die Blutversorgung über die kontralaterale ACI erlaubt bei der Maus eine vollständige Reperfusion, da die ACI anders als beim Menschen beim Nager integraler Bestandteil des Circulus arteriosus ist (Lee 1995). Nach der Prozedur wurde den Tieren 1 ml 0,9%-ige Natriumchloridlösung peritoneal verabreicht, um einer Hypovolämie vorzubeugen.

Im Rahmen der Versuche verstarben zwei Tiere innerhalb von sechs Stunden postoperativ, was als direkte Operationsfolge gewertet wurde. Diese gingen somit nicht in die Auswertung ein. Wie mit Tieren verfahren worden ist, die nach Ablauf dieser sechs Stunden und vor geplanter Perfusion sieben Tage nach MCAO verstarben, ist in Kapitel 4.7.3 (für die Beurteilung des Schlaganfall-Outcomes) und Kapitel 4.8 (für die histologische Auswertung) dargestellt.

Anhand eines scheinoperierten Tieres wurde sichergestellt, dass die Narkose selbst keine histologische Auffälligkeit in einer der drei Färbungen und auch kein motorisches Defizit nach sich zog. Ein Tier verstarb perioperativ und wurde aus der Auswertung ausgeschlossen.

4.7 Beurteilung des funktionellen Outcomes nach MCAO

4.7.1 Score nach Bederson

Zur Evaluierung des funktionellen Outcomes der Tiere nach MCAO wurde neben dem Gridwalk-Test (siehe Kapitel 4.7.2) der Score nach Bederson verwendet (Bederson et al. 1986). Dieser besteht aus den Teilen Vorderlaufextension, lateral push und Kreislaufen, welche nacheinander je einmal pro Tier nach MCAO durchgeführt wurden und im Folgenden einzeln beschrieben werden. Der Versuch wurde auf einem feststehenden Tisch durchgeführt, dessen Arbeitsfläche mit einem Vlies ausgelegt war. Bei Urin- oder Kotabgang eines Tieres wurde der Arbeitsplatz mit Desinfektionsmittel (Descosept AF, Dr. Schumacher, Malsfeld, Deutschland) sprühdesinfiziert und das Vlies erneuert, um vergleichbare Voraussetzungen für alle Tiere zu schaffen.

In Tabelle 2 ist die sequenzielle, ordinal skalierte Einteilung des Scores nach Bederson dargestellt (Bederson et al. 1986).

Gradeinteilung	Funktionelles Outcome
Grad 0	Kein mit den nachfolgenden Tests erfassbares neurologisches Defizit
Grad 1	Vorderlaufextension nicht seitengleich
Grad 2	Grad 1 und zusätzlich Lateral Push nicht seitengleich
Grad 3	Grad 2 und zusätzlich Kreislaufen positiv

Tabelle 2: Score nach Bederson (Bederson et al. 1986) zur Beurteilung des funktionellen Outcomes von Kleinnagern nach MCAO.

Vorderlaufextension

Zum Test der Vorderlaufextension wurde das Tier etwa 3 cm über einer mit Vlies ausgelegten ebenen Fläche 5-10 s durch den Untersucher kopfüber am Schwanz festgehalten und dabei auf die Bewegung der Vorderläufe geachtet. Tiere ohne Hemiparese streckten beide Vorderläufe im Sinne einer Fluchtbewegung zum Boden hin. Stattdessen bewirkte ein Schlaganfall (in für die Motorik relevanten Hirnarealen) die Extension lediglich des ipsilateralen Vorderlaufs und der kontralaterale Vorderlauf verblieb flektiert. Das Testergebnis jeder Maus wurde entweder als seitengleiche oder nicht seitengleiche Vorderlaufextension formuliert.

Lateral Push

Für den Lateral Push Test wurde das Tier auf ein Vlies gesetzt und am Schwanz festgehalten. Mit einer 1 cm breiten, auf Körpertemperatur erwärmten Pinzette wurde ein Druck auf die Rumpfseite des Tieres zwischen Vorder- und Hinterläufen ausgeübt. Dieser Druck sollte in der Lage gewesen sein, die Maus auf dem Vlies seitlich zu verschieben. Der Test wurde mehrfach in beide Richtungen durchgeführt. Motorisch wenig oder unbeeinträchtigte Tiere stemmten sich der passiven Bewegung nach beiden Seiten gleichermaßen entgegen. Hemiparetische Mäuse leisteten dem Druck in Richtung der paretischen Seite hingegen weniger Widerstand als in Richtung der gesunden Seite. Der Test wurde als nicht seitengleich gewertet, wenn in Richtung der paretischen Seite gar kein oder weniger Widerstand geleistet wurde als bei Druck in die Gegenrichtung, und andernfalls als seitengleich.

Kreislaufen

Für diesen Versuchsteil wurde das Tier auf dem Vlies der freien Bewegung überlassen. Bei einigen Tieren war hierbei zu beobachten, dass sie außer Stande waren, eine Strecke von etwa 10 cm geradeaus zu laufen. Stattdessen drehten sie sich im Kreis in Richtung der Hemiparese. Ein solcher Befund ließ auf eine schwerwiegende motorische Beeinträchtigung nach MCAO schließen und ging als Kreislaufen positiv in den Score nach Bederson ein.

4.7.2 Gridwalk-Test

Der Gridwalk-Test ist ein motorischer Test, der die Fähigkeit von Versuchstieren beurteilt, über ein Lochgitter zu laufen (Bresnahan et al. 1987), und der somit zur Quantifizierung des funktionellen Outcomes nach Ischämien des zentralen Nervensystems herangezogen werden kann (Behrmann et al. 1992). Er diente im hier beschriebenen Versuchsaufbau als Ergänzung zum Score nach Bederson. Seine Sensitivität ist im Nagermodell in der frühen postischämischen Phase (<30 d) in Bezug auf das motorische Defizit höher als diejenige des Scores nach Bederson, da er insbesondere innerhalb geringgradiger Defizite besser differenziert (Zhang et al. 2002, Aronowski et al. 1996). Allerdings lassen sich schwere Defizite in dem Fall nicht mehr differenzieren, wenn das Tier nicht mehr im Stande war, über das Gitter zu laufen. Gezählt werden bei diesem Test die Fehlritte, die ein Tier innerhalb von 2 min reiner Laufzeit zur freien Exploration auf einem Lochgitter zu verzeichnen hatte. Da der Gridwalk-Test so empfindlich ist, dass auch gesunde Tiere Fehlritte machen, wurde er einmal vor der MCAO durchgeführt und einmal danach, um das durch den Schlaganfall verursachte motorische Defizit als Quotient aus den Trittfehlern vor und den Trittfehlern nach MCAO ausdrücken zu können (Gridwalk-Quotient). Um die Vergleichbarkeit der Tiere zu gewährleisten, wurde der Versuch vor MCAO jeweils zwei Tage vor dem Eingriff und der Test nach MCAO am vierten Tag nach der Okklusion durchgeführt. Das Lochgitter (Maße: 40 cm x 40 cm, Lochgröße: 11 mm x 11 mm, Eigenbau; Aufbau siehe Abbildung 4) stand 10 cm erhöht auf einem Tisch und wurde von vier Seiten durch eine geschlossene, 50 cm hohe Plexiglaswand umrahmt, um das Versuchstier vor dem Herunterfallen zu schützen und ein Beobachten von außen zu ermöglichen.



Abbildung 4: Versuchsaufbau des Gridwalk-Tests

Zudem wurden für den Test ein Camcorder (HDC-DX1, Panasonic, Osaka, Japan) zur Videoaufzeichnung und zwei Stoppuhren benötigt. Der Camcorder wurde neben das Gitter auf der Tischplatte postiert, sodass das gesamte Lochgitter von schräg unten durch das Display des Gerätes einsehbar war. Eine der beiden Stoppuhren (im Folgenden Uhr 1) diente zur Zeitnahme der 10 min Gesamtversuchszeit; die andere (Uhr 2), um die geforderten 2 min Laufzeit des Tieres zu dokumentieren. Beide Uhren wurden zum Schallschutz unterhalb der Tischebene positioniert.

Unmittelbar nach Starten der Videoaufzeichnung wurde das Versuchstier auf das Gitter gesetzt. Uhr 1 wurde mit einem Countdown von 10 min gestartet, sobald das Tier auf dem Gitter stand. Nur während sich das Tier bewegte, wurde bei Uhr 2 der Countdown von 2 min heruntergezählt. Fehlritte wurden nur gezählt, wenn der Countdown von Uhr 2 aktiv war. Gesetzt den Fall, das Versuchstier hatte nach 6 min (Uhr 1) noch nicht die geforderten 2 min Laufzeit absolviert, so wurde es mit einer Lampe im Gesicht beleuchtet. Dieses Manöver bewirkte in der Mehrzahl der Fälle eine Wiederaufnahme der Lokomotion und das Erreichen der 2 min Laufzeit. Waren die geforderten 2 min Laufzeit nicht innerhalb von höchstens 10 min erbracht, so wurde der Versuch als Abbruch gewertet und dementsprechend dokumentiert. Die während des Versuchs ausgezählte Trittfehlerzahl wurde im Nachhinein mit der Video-Software VLC Media Player (Version 1.1, VideoLAN, Paris, Frankreich) verifiziert. Ein Fehltritt wurde definiert als ein Durchtritt einer Extremität durch das Lochgitter über das Vorderlaufgrund- beziehungsweise Sprunggelenk hinaus (Abbildung 5). Dies äußerte sich auch in Form einer Störung der Rumpfbalance mit Tiefertreten einer Schulter oder Hüfte. Schließlich wurde als Zielgröße der Quotient aus der Anzahl der Trittfehler nach und vor MCAO gebildet (Gridwalk-Quotient).



Abbildung 5: Einzelbild aus einem Gridwalk-Test. Gezeigt ist ein Lochdurchtritt, der als Fehltritt gewertet wurde, da zu erkennen ist, dass das rechte Vorderbein inklusive Grundgelenk das Lochgitter passiert hat.

4.7.3 Global-Score zur Beurteilung des funktionellen Outcomes nach MCAO

Um das funktionelle Outcome nach MCAO, welches im Bederson-Score und im Gridwalk-Test gemessen wurde, in einer Maßzahl auszudrücken und quantifizieren zu können, die zudem das Versterben als schlechtestes Schlaganfall Outcome berücksichtigt, bildeten wir eine ordinale Maßzahl. Diese wird im Folgenden als Global-Score bezeichnet wird. Dieser erlaubt ausgehend vom sequenziellen, ordinal skalierten Score nach Bederson (Bederson et al. 1986) mit Hilfe der Trittfehler im Gridwalk-Test eine feinere Differenzierung der Ausprägung geringgradiger motorischer Defizite als mit einer alleinigen Beurteilung durch den Bederson-Score. Zudem berücksichtigt der von uns konzipierte Global-Score analog zu Scoring-Systemen nach Schlaganfall beim Menschen anders als der Bederson-Score zusätzlich das Versterben als schlechtestes Schlaganfall-Outcome. Wie Abbildung 6 zeigt, korrelierten die Ergebnisse von Gridwalk und Bederson-Score in der vorliegenden Stichprobe auf signifikante Art und Weise positiv ($r = 0,495$, $p < 0,001$), sodass eine Inklusion des Gridwalk-Tests in den Bederson-Score vertretbar war.

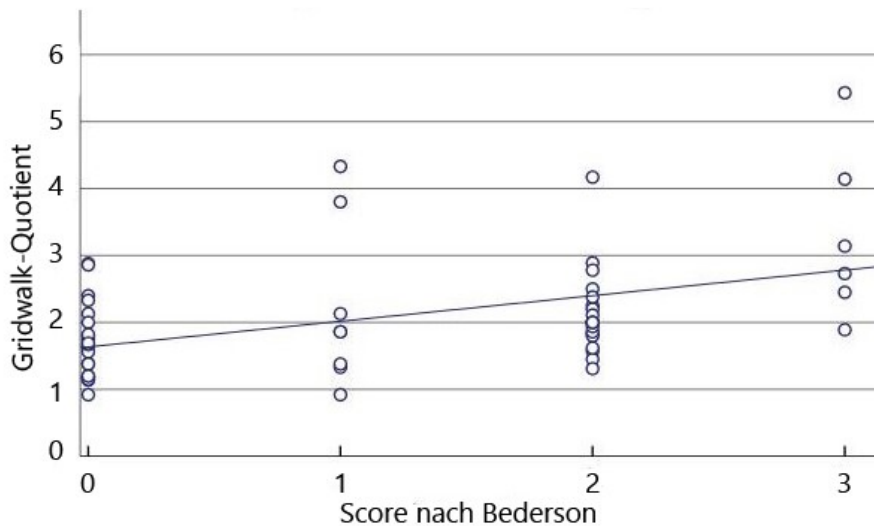


Abbildung 6: Korrelation des Bederson-Scores (Bederson et al. 1986) mit dem Quotienten aus den Trittfehlern nach MCAO und den Trittfehlern vor MCAO. Es zeigt sich eine signifikante Korrelation beider Parameter mit positivem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman von $r = 0,495$ und einer Signifikanz $p < 0,001$.

Der im Gridwalk-Test als Zielgröße angegebene, metrisch skalierte Gridwalk-Quotient ist aufgrund des fehlenden Maximalwertes nicht zur Inklusion in den Bederson-Score, der eine Ordinalskala darstellt und einen Maximalwert aufweist, geeignet. Deshalb ist eine Umwandlung des Gridwalk-Quotienten in eine Ordinalskala nötig, die im Folgenden beschrieben wird. Im Histogramm des Gridwalk-Quotienten fallen fünf Häufigkeitsgipfel auf (Abbildung 7). Basierend auf diesen Gipfeln wurde der Gridwalk-Quotient in fünf Stufen eingeteilt, die ähnlich wie der Bederson-Score eine ordinale Skala bilden, in der einer Stufe ein definierter Wertebereich des Gridwalk-Quotienten zugeordnet ist, Abbildung 7 zeigt die Wertebereiche des Gridwalk-Quotienten mit der entsprechenden Zuordnung zum Gridwalk-Quotienten-Score.

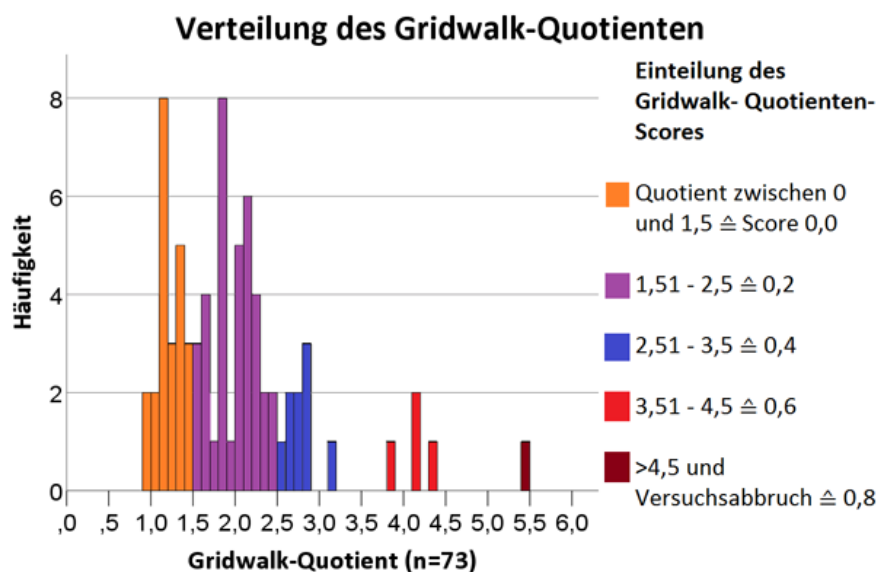


Abbildung 7: Histogramm zur Darstellung der Verteilung des Parameters Gridwalk-Quotient über alle Versuchstiere. Beachte die eingefärbten Häufigkeitsgipfel, auf denen die Stufen des Gridwalk-Quotienten-Score basieren.

Die Stufen des Gridwalk-Quotienten-Scores wurden in Form einer Dezimalzahl mit der Vorkommastelle „0“ und einer geraden Nachkommastelle zwischen 0 und 8 gewählt, sodass die niedrigste Stufe des Scores „0,0“ und die höchste „0,8“ ist. Neben einem Gridwalk-Quotienten > 4,5 wurde auch ein Versuchsabbruch im Gridwalk-Test nach 10 min der höchsten Stufe im Gridwalk-Quotienten-Score zugeordnet, da in diesem Fall von einem schwerwiegenden motorischen Defizit ausgegangen werden musste. Die Inklusion des Gridwalk-Quotienten-Score in den Bederson-Score erfolgte durch einfache Addition beider Werte. Dieser modifizierte Score nach Bederson (im Folgenden Global-Score genannt) weist somit auf jeder Stufe (0, 1, 2 und 3) des Bederson-Scores eine Nachkommastelle auf, die durch

den Gridwalk-Quotienten-Score bestimmt wird. Dadurch werden die detektierten Defizite im Bederson-Score höher als diejenigen im Gridwalk-Test gewertet (siehe Tabelle 3). Auf diese Weise wird der Tatsache Rechnung getragen, dass der Gridwalk-Test im Gegensatz zum Bederson-Score ein motorischer Test ist, der eher zwischen geringgradigen motorischen Defiziten zu unterscheiden vermag. Um auch das Versterben eines Tieres in Folge des Schlaganfalls als Outcome abbilden zu können, wurde jedem Tier, das nicht bis zum siebenten Tag nach MCAO überlebte und dessen vorzeitiger Tod nicht als Operationsfolge (6 h nach MCAO) gewertet wurde, die Stufe „4“ im Global-Score zugeordnet. Durch diese wurden in diesem Versuch die Tiere mit dem schlechtesten Outcome repräsentiert. Die Zuordnung zur Stufe „4“ wurde ungeachtet der vom jeweiligen Tier erzielten Ergebnisse im Bederson-Score und im Gridwalk-Test vorgenommen.

Tabelle 3 zeigt die Zuordnung der getesteten Tiere zu Bederson-Score, Gridwalk-Quotienten-Score und Global-Score.

Bederson-Score	Gridwalk-Quotienten-Score	Global-Score	Anzahl Tiere		
0			23		
	0,0	0,0	10		
	0,2	0,2	11		
	0,4	0,4	2		
	0,6	0,6	0		
	0,8	0,8	0		
1			9		
	0,0	1,0	3		
	0,2	1,2	3		
	0,4	1,4	0		
	0,6	1,6	2		
	0,8	1,8	1		
2			24		
	0,0	2,0	2		
	0,2	2,2	14		
	0,4	2,4	3		
	0,6	2,6	1		
	0,8	2,8	4		
3			5		
	0,0	3,0	0		
	0,2	3,2	2		
	0,4	3,4	1		
	0,6	3,6	0		
	0,8	3,8	2		
		4,0	7	Bederson-Score Gesamtanzahl	Global-Score Gesamtanzahl
				61	68

Tabelle 3: Anzahl der Tiere in Gridwalk-Quotienten-, Bederson- und Global-Score. Man beachte die differenziertere Aufgliederung des Schlaganfall-Outcomes mit dem Global-Score durch Inklusion des Gridwalk-Quotienten-Score in den Bederson-Score im Vergleich zum Bederson-Score allein und die Tatsache, dass durch den Global-Score sieben Tiere mehr erfasst werden als durch den Bederson-Score allein, nämlich zusätzlich die in Folge des Schlaganfalls verstorbenen Tiere.

Die Versuche zum Schlaganfall-Outcome wurden im Rahmen des experimentellen Protokolls an insgesamt 40 weiblichen und 28 männlichen Mäusen durchgeführt. Sieben Tiere davon verstarben vor Ablauf der geforderten sieben Tage nach MCAO, also vor Gewinnung der Hirnschnitte.

4.8 Histologische Beurteilung der Schlaganfallgröße

Die Anfertigung der koronaren Hirnschnitte und der Färbungen oblag erfahrenen Medizintechnischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe, um Schnitte und Färbungen von vergleichbarer und hoher Qualität zu erhalten. Sieben Tage nach MCAO wurden die Hirne entnommen und perfusionsfixiert. Anschließend wurden Kryoschnitte angefertigt, welche nach den im Anhang (Kapitel 9.1) aufgeführten Protokollen in der Übersichtsfärbung Kresylviolett sowie in den immunhistochemischen Färbungen GFAP und MAP2 angefärbt wurden.

Insgesamt durchliefen die Versuche zur Infarktgrößenbestimmung nach MCAO in den drei genannten Färbungen analog zu den Versuchen zum funktionellen Outcome 40 weibliche und 28 männliche Tiere. In den sieben Tagen nach MCAO verstarben vier von 15 weiblichen und eins von neun männlichen Tieren in der Gruppe GC (E16/17), zudem zwei von zehn Männchen der Gruppe MS. Diese Tiere wurden ebenso aus der Auswertung der Infarktgröße ausgeschlossen wie ein weibliches Kontrolltier, bei dem mehrere koronare Hirnschnitte nicht vollständig auf dem Objektträger abgebildet waren.

4.8.1 Kresylviolett-Färbung

Die Kresylviolett-Färbung ist eine Standardfärbung zur Darstellung untergegangener Neurone. Sie färbt ischämisch geschädigte Neurone im Infarktkern (Tureyen et al. 2004). Kresylviolett (CV) bindet als basischer Farbstoff der DNA im zentralen Nervensystem an die basophilen Strukturen im neuronalen Zytoplasma, insbesondere an die RNA-reichen Ribosomen. So färbt sich intaktes Zytoplasma in intaktem Gewebe dunkelblau, von Zelluntergang betroffenes Gewebe hingegen in einem helleren Blau an (Tureyen et al. 2004). Zudem bindet CV im Zellkern ans endoplasmatische Retikulum und dokumentiert so nach MCAO eine Hypotrophie der Kernstrukturen (Karyolyse), was sich in einer Schrumpfung der Neurone und deren Dreiecksform nach Ischämie widerspiegelt (Alvarez-Buylla et al. 1990, Bartus et al. 1995).

4.8.2 Immunhistochemische Färbungen

MAP2-Färbung

Mit Hilfe eines entsprechenden Antikörpers kann MAP2 mittels ABC-Technik angefärbt werden (Schwab et al. 2001), welches der Stabilität des Zytoskeletts und der Nährstoffversorgung der Nervenfortsätze dient (Kitagawa et al. 1989). Die durch den Energieverlust nach zerebraler Ischämie verminderte Synthese des Proteins führt demnach zu einer verminderten MAP2-Immunreaktivität, welche valide histologisch quantifiziert werden

kann (Dawson und Hallenbeck 1996). Areale mit verminderter MAP2-Immunreaktivität entsprechen dabei früh postischämisch geschädigtem, aber nicht nekrotischem Gewebe (Li et al. 2000). Die verminderte Anfärbbarkeit von MAP2 nach zerebraler Ischämie kann somit als Surrogatparameter für die Penumbra angesehen werden (Kitagawa et al. 1989, Dawson und Hallenbeck 1996).

GFAP-Färbung

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) kann mittels ABC-Methode mit einem Antikörper gegen dieses Molekül angefärbt werden (Eng 1985). Es ist in Astrozyten des ZNS nachweisbar und dort Hauptbestandteil des Zytoskeletts (Eng und DeArmond 1981). Ihm kommt insbesondere nach zerebralen Ischämien eine wichtige Rolle bei Reorganisationsvorgängen im Rahmen der reaktiven Astroglie zu, die sich in geschädigtem Gewebe durch Immunreaktion eines entsprechenden Antikörpers gegen GFAP darstellt (Herrera und Cuello 1992). Auf diese Weise kann mit der GFAP-Färbung näherungsweise die Infarkt Narbe nach zerebraler Ischämie visualisiert werden (McKeon et al. 1991).

4.8.3 Bestimmung der Infarktgröße

Das Infarktvolumen wurde nach Berechnung der betroffenen Fläche im jeweiligen Hirnschnitt volumetrisch ermittelt und die Zielgröße als Anteil des Infarktes an der ipsilateralen Hemisphäre definiert. Hierzu wurden die 30 µm dicken histologischen Schnitte mit ein und demselben optischen System, bestehend aus Lichtmikroskop (Axioplan2, Carl Zeiss, Aalen, Deutschland), Kamera (AxioCam MRc5, Carl Zeiss), kompatiblen Objektiven (in den Vergrößerungen 1,25x, 2,5x, 4x, 10x) und entsprechender Software (Axiovision 4.7 und Modul MosaicX, Carl Zeiss), eingescannt und als TIFF-Dateien gespeichert. Den Schnitten wurde jeweils eine Skalierung hinzugefügt.

Die Ermittlung der Infarktgröße erfolgte mit Hilfe der Software Adobe Photoshop CS 4 (Adobe Systems, San José, USA). Der erste für die Volumetrie zu wertende Schnitt wurde bei Bregma -2,8 mm definiert, der letzte bei Bregma -4,5 mm. Jedem Hirnschnitt wurde ein Wert Bregma ± x mm zugeordnet, um eine Lokalisation der Frontalschnitte auch in der Sagittalen vornehmen zu können.

Zunächst wurde für jeden Schnitt die Größe beider Hemisphären separat abzüglich der Fläche der Hirnventrikel bestimmt, um durch den Vergleich von ischämischer und nicht-ischämischer Hemisphäre ein eventuelles Infarktödem zu detektieren. Dann wurde mit Hilfe der Software

für den jeweiligen Hirnschnitt die als Infarkt zu wertende Fläche markiert und der Flächeninhalt berechnet. Die ermittelten Werte wurden in eine Tabelle der Software Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA) eingetragen und die folgenden Berechnungen mit diesem Programm realisiert. Ein Volumen ergab sich letztlich aus der Multiplikation der Hemisphären- beziehungsweise Infarktfläche mit der Zahl der ausgewerteten Schnitte und dem Abstand der Schnittebenen. Anschließend wurde der prozentuale Anteil des Infarktvolumens am Gesamtvolumen der ischämischen Hemisphäre berechnet und als Zielgröße für die Infarktgröße herangezogen. Hatte ein Versuchstier nicht 7 Tage nach MCAO überlebt (lagen also keine Hirnschnitte vor), so wurde das Tier aus der Auswertung zur Infarktgröße ausgeschlossen.

4.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS Statistics Version 24.0 (IBM, Armonk, USA) für Windows. In den Diagrammen wurde eine Darstellung in Form von Boxplots gewählt, da die Parameter in den Stichproben häufig nicht normalverteilt waren und eine Visualisierung der Verteilung so besser gelang. In den Boxplots spiegeln sich die Angaben für den kleinsten und den größten nicht extremen Wert (5 %- und 95 %-Perzentil), für das 25 %- und das 75 %-Perzentil sowie für den Median wider. Ausreißer wurden in den Diagrammen separat markiert. Für die interindividuellen Gruppenvergleiche hinsichtlich aller Outcome-Parameter wurden die Geschlechter getrennt betrachtet. Bei den Volumina beider Hemisphären lag im Shapiro-Wilk-Test eine Normalverteilung vor (Shapiro et al. 1968). Deshalb wurde hier der T-Test für unabhängige Stichproben verwendet (Lew und Menon 1991). Alle anderen Parameter waren nicht normalverteilt, sodass im Übrigen der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung kam (Mann und Whitney 1947). Eine Korrelation zwischen zwei Parametern wurde mit dem Spearman-Rho-Test geprüft (Spearman 1987). Für alle Tests wurde als Signifikanzniveau 0,05 angenommen. Zur Adjustierung des Signifikanzniveaus bei multiplen Paarvergleichen wurde eine alpha-Korrektur nach Bonferroni-Holm durchgeführt (Aickin und Gensler 1996). Alle arithmetischen Mittelwerte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

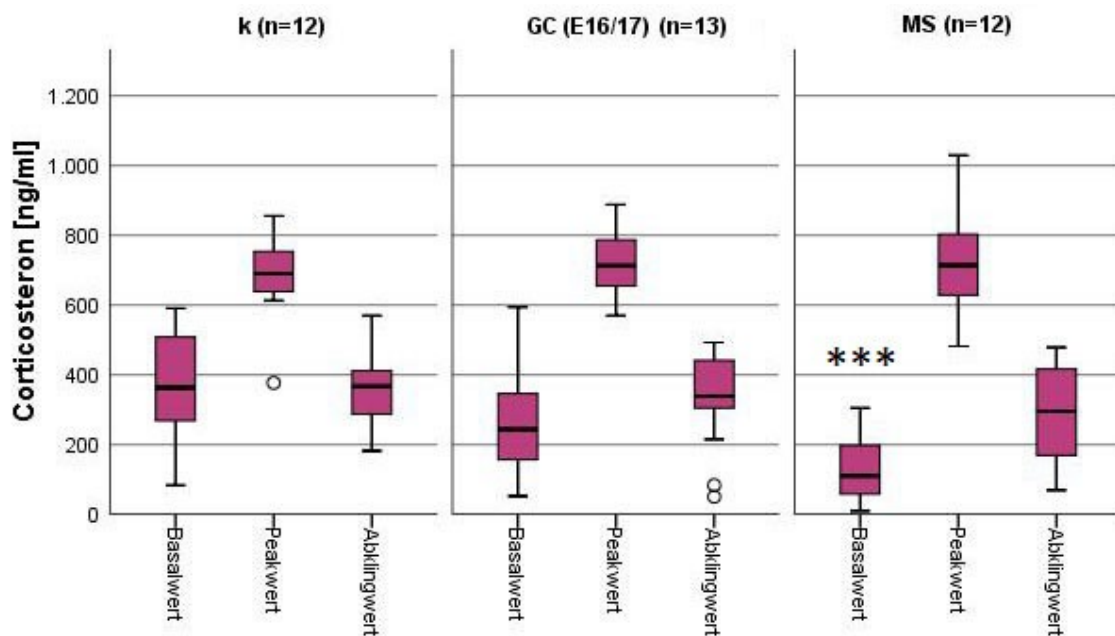
5 ERGEBNISSE

5.1 Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf die Aktivität der HHN-Achse

Die Aktivität der HHN-Achse wurde durch je eine Blutentnahme in Ruhe, nach 20 min Restraint-Stress und 90 min nach der ersten Blutentnahme (Abklingwert) und den daraus berechneten Parametern (Peak-Anstieg, Peak-Abfall, AUC-Antwort) quantifiziert. Eingang in die Auswertung fanden die Werte nur dann, wenn alle drei Blutentnahmen gelangen.

Corticosteron-Basal-, -Peak- und -Abklingwert

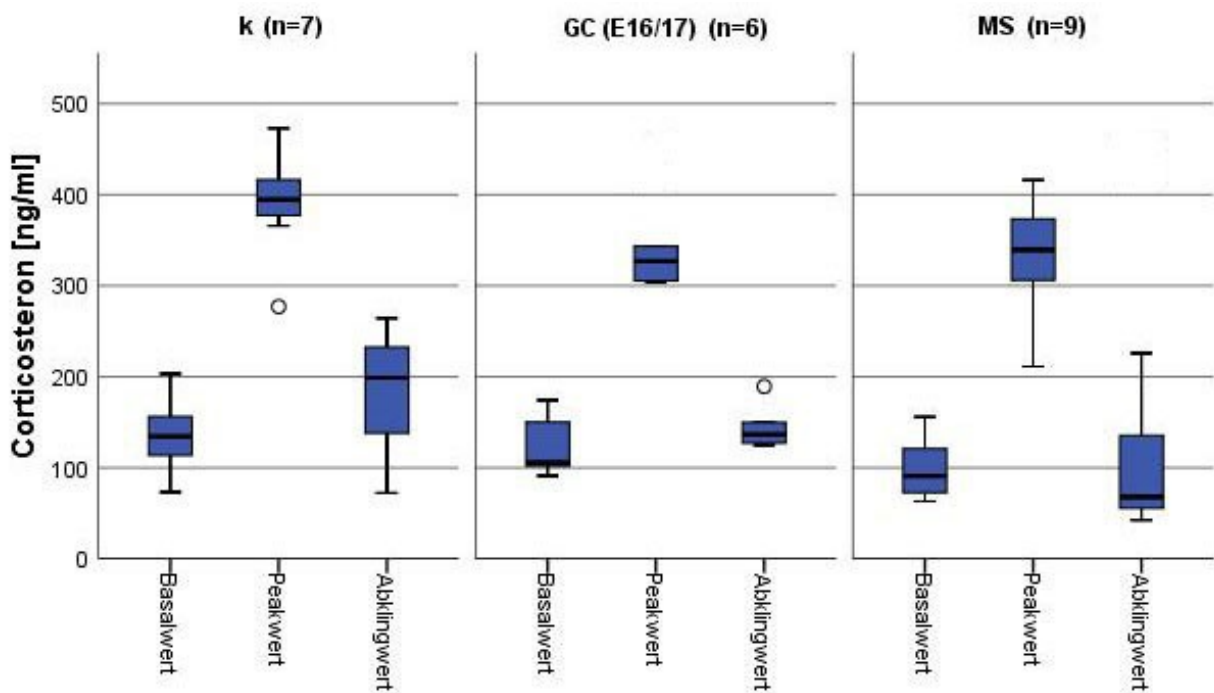
Ein zwanzigminütiger Restraint-Stress erzeugte zuverlässig einen Anstieg der Corticosteron-Konzentration von Basal- zu Peak-Wert (Abbildung 8, Signifikanzen in der Abbildung nicht gezeigt). Weibliche Tiere der Gruppe MS, nicht jedoch pränatal mit GC behandelte Weibchen, wiesen einen niedrigeren CORT-Basalwert auf als Kontrollen (Abbildung 8). Hinsichtlich Peak- und Abklingwert gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen.



Basalwert: vor 20 min Restraint-Stress
Peakwert: unmittelbar nach 20 min Restraint-Stress
Abklingwert: 90 min nach Basalwert

Abbildung 8: Basal-, Peak- und Abklingwert der weiblichen Mäuse in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. MS-Weibchen weisen einen niedrigeren Basalwert auf als die Kontrollen (***) ($p < 0,001$).

Bei den männlichen Tiere schien die MS keinen Einfluss auf den CORT-Basalwert zu haben. Auch hinsichtlich der Peak- und Abklingwert zeigten sich keine Unterschiede von GC (E16/17) und MS gegenüber den Kontrollen (Abbildung 9).



Basalwert: vor 20 min Restraint-Stress
 Peakwert: unmittelbar nach 20 min Restraint-Stress
 Abklingwert: 90 min nach Basalwert

Abbildung 9: Basal-, Peak- und Abklingwert der männlichen C57/Bl6-Mäuse in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Corticosteron-Anstieg

Bei den Weibchen führten sowohl die pränatale GC-Therapie als auch die MS im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer höherem Anstieg der CORT-Peak-Konzentration nach 20-minütigem Immobilitätsstress (Abbildung 10). Bei den Männchen waren zwischen den Gruppen keine Unterschiede erkennbar (Abbildung 11).

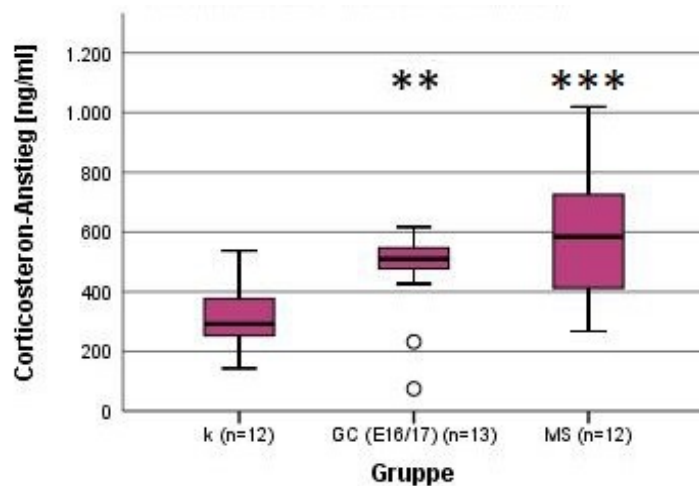


Abbildung 10: Anstieg des CORT vom Basal- zum Peakwert der Weibchen in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Sowohl die pränatale GC-Behandlung als auch die MS führen zu einem höheren Anstieg des CORT (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

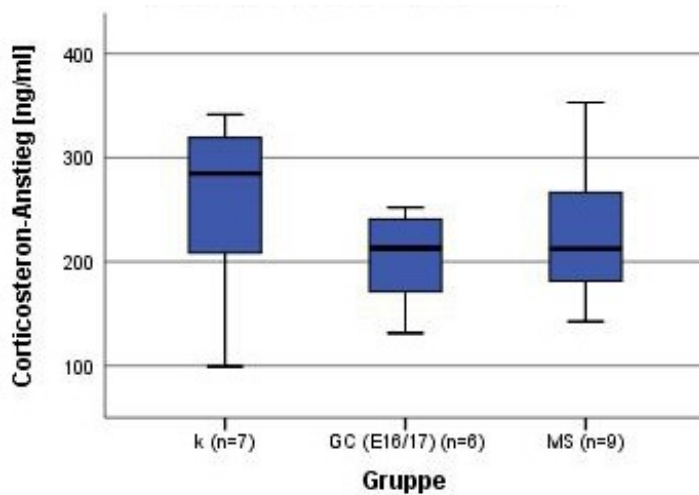


Abbildung 11: Anstieg des CORT vom Basal- zum Peakwert der Männchen in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Fläche unter der Kurve (AUC-Antwort)

Um die Antwort der HHN-Achse auf den 20-minütigen Imbolititätsstress zu quantifizieren, wurde die Fläche unter der Kurve (AUC), normiert auf den individuellen Basalwert, berechnet und im Folgenden als AUC-Antwort bezeichnet (siehe Kapitel 4.4). Sowohl eine pränatale GC-Therapie als auch die MS führten bei den Weibchen im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einer gesteigerten Stressantwort (Abbildung 12). Bei den Männchen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Aktivität der HHN-Achse (Abbildung 13).

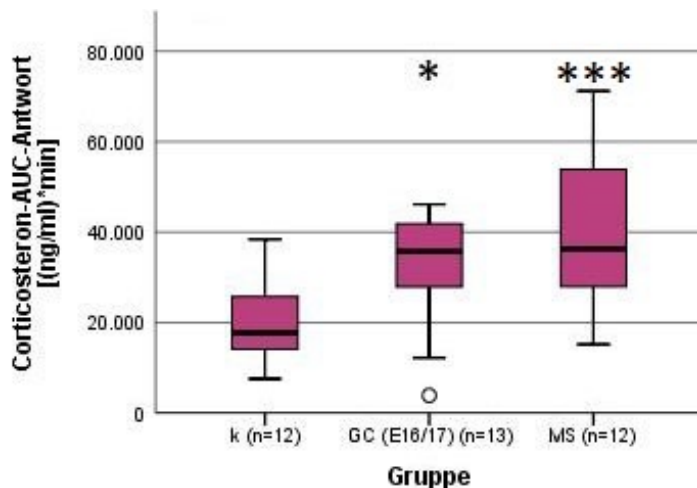


Abbildung 12: Stressantwort der weiblichen Mäuse in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Pränatale GC-Therapie und MS führen zu einer stärkeren Stressantwort (** $p < 0,001$; * $p < 0,05$).

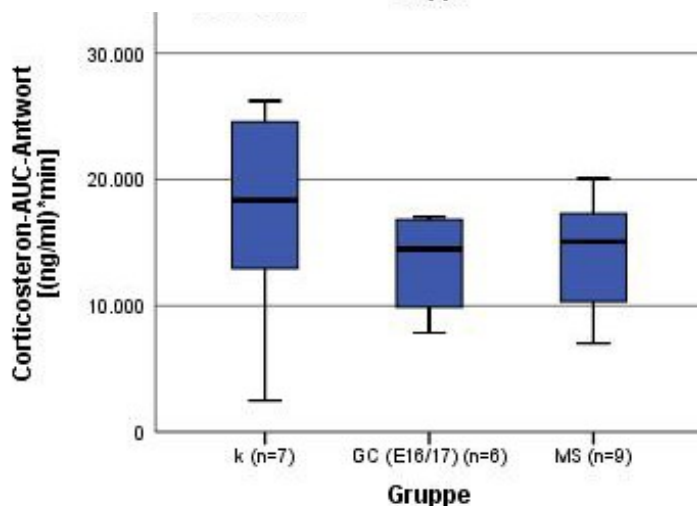


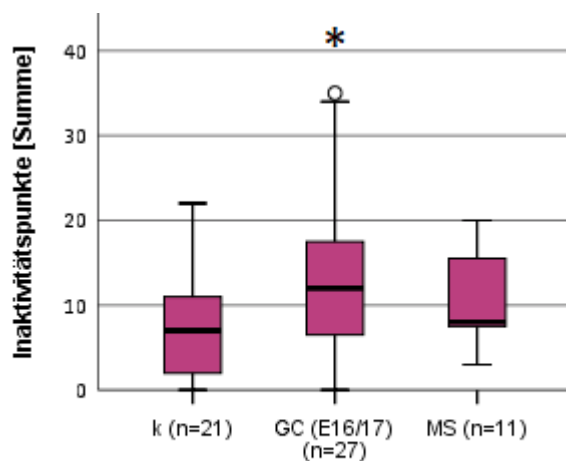
Abbildung 13: Stressantwort der männlichen Mäuse in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Im Anhang (Kapitel 9.2) finden sich weitere statistische Daten zu allen verwendeten Parametern in Form einer deskriptiven Statistik.

5.2 Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf das Verhalten

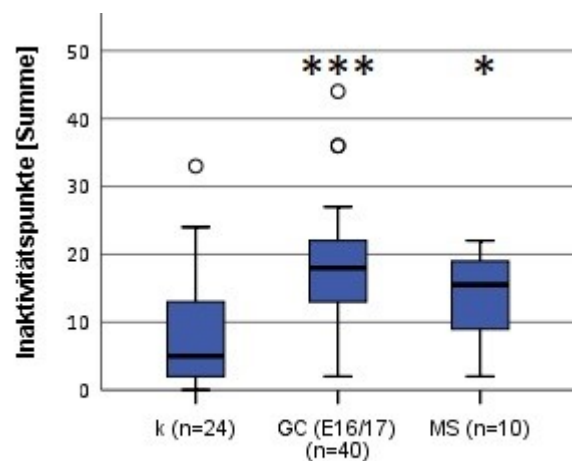
Der Schwanzhalteversuch ermöglichte eine Quantifizierung depressiven Verhalten der Versuchstiere, da die gemessene Inaktivität, ausgedrückt in Inaktivitätspunkten, als ein Surrogatparameter für depressives Verhalten angesehen werden kann. Das theoretische Maximum der Inaktivitätspunkte betrug in 8 min Versuchszeit 96 Punkte (siehe Kapitel 4.5). Ein solches Ergebnis, das einer durchgehenden Inaktivität ohne Fluchtverhalten entspricht, entfiel auf keines der untersuchten Tiere. Das Höchstmaß an Inaktivität zeigte mit 44 Inaktivitätspunkten ein männliches Versuchstier aus der Gruppe GC (E16/17). Acht von 137 Tieren, darunter sieben Kontrolltiere, zeigten innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 8 min keinerlei Inaktivität.

Die pränatale GC-Therapie führte zu einer erhöhten Inaktivität der weiblichen Tiere im Schwanzhalteversuch (Abbildung 14). Die postnatal von der Mutter separierten Weibchen zeigten kein inaktiveres Verhalten als die Tiere der Kontrollgruppe. Bei den Männchen hatte sowohl eine pränatale GC-Therapie als auch als auch die MS ein depressiveres Verhalten im Schwanzhalteversuch zur Folge (Abbildung 15).



Versuchsdauer 8 Minuten; 5 Sekunden Inaktivität entsprechen einem Inaktivitätspunkt (IA)

Abbildung 14: Inaktivität im Schwanzhalteversuch der weiblichen Mäuse in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Die pränatale GC-Behandlung führt zu einer höheren Inaktivität (* $p < 0,05$).



Versuchsdauer 8 Minuten; 5 Sekunden Inaktivität entsprechen einem Inaktivitätspunkt (IA)

Abbildung 15: Inaktivität im Schwanzhalteversuch der männlichen Mäuse in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Sowohl die pränatale GC-Behandlung als auch die Mutterseparation führen zu einer höheren Inaktivität (***) $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Im Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Tieren zeigten Männchen nach pränataler GC-Therapie eine höhere Inaktivität als die Weibchen der selben Gruppe (Abbildung 16). Da die Weibchen nach pränataler GC-Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl eine höhere Inaktivität im Schwanzhalteversuch als auch eine höhere Aktivität der HHN-Achse aufwiesen (AUC-Antwort), war die Prüfung einer statistischen Beziehung zwischen Inaktivität im Schwanzhalteversuch und Aktivität der HHN-Achse interessant. Dabei fand sich bei den Weibchen ebenso wie bei den Männchen in Folge einer pränatalen GC-Therapie keine Korrelation zwischen Inaktivitätspunkten im Schwanzhalteversuch und AUC-Antwort (Abbildung 17).

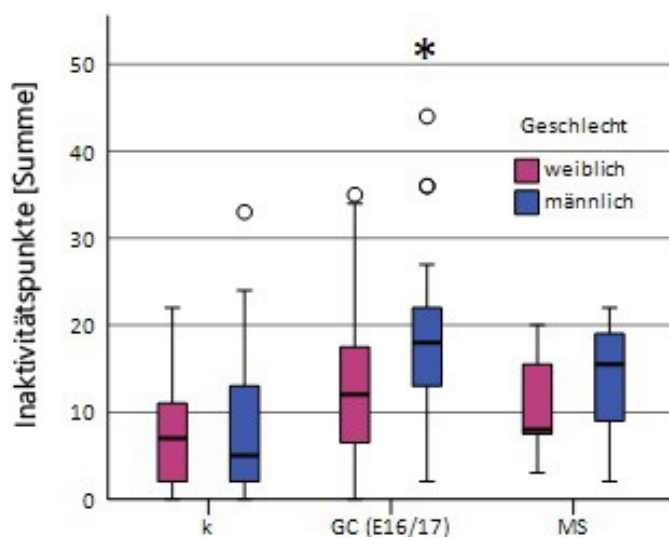


Abbildung 16: Inaktivität im Schwanzhalteversuch in Abhängigkeit des Geschlechts. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Die männlichen Tiere zeigen nach pränataler GC-Therapie eine höhere Inaktivität als die Weibchen (* $p < 0,05$).

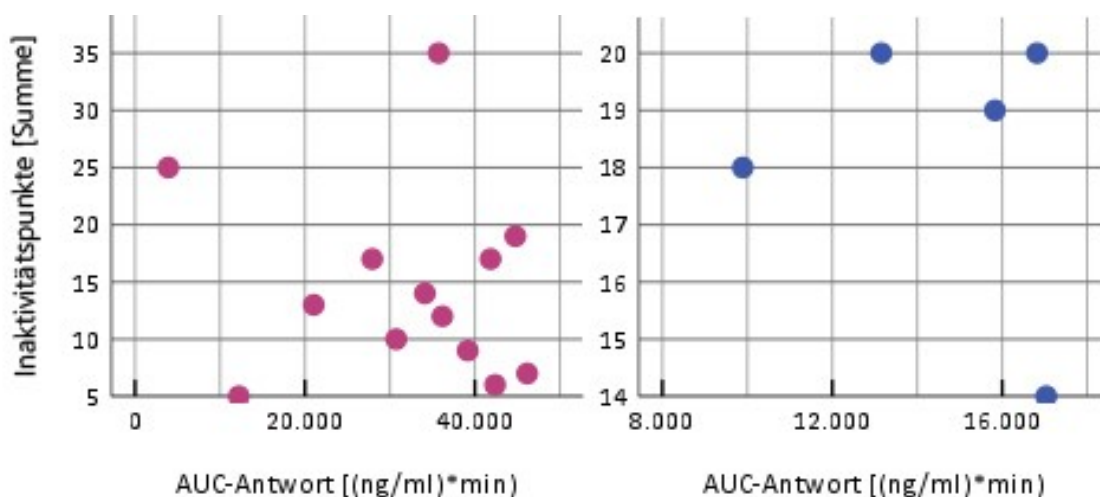


Abbildung 17: Beziehung zwischen Inaktivität im Schwanzhalteversuch und Aktivität der HHN-Achse innerhalb der Gruppe GC (E16/17). Für beide Geschlechter besteht keine Korrelation zwischen depressivem Verhalten und Aktivität der HHN-Achse (linker Teil der Abbildung: Weibchen; rechts: Männchen).

5.3 Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf das funktionelle Outcome nach MCAO

Zur Beurteilung des funktionellen Outcomes nach induzierter zerebraler Ischämie wurde der Global-Score (siehe Kapitel 4.7) herangezogen. Sowohl die männlichen als auch die weiblichen pränatal mit GC behandelten Tiere, aber nicht MS-Tiere beider Geschlechter, zeigten nach MCAO ein schwerwiegenderes motorisches Defizit als die Tiere der Kontrollgruppe (Abbildung 18 und Abbildung 19). Auch die deskriptiven Parameter wiesen auf den Effekt hin, dass Tiere in Folge einer pränatalen GC-Therapie offenbar schwerer betroffen waren. So verstarben in den sieben Tagen nach MCAO vier von 15 weiblichen und eins von neun männlichen Tieren in dieser Gruppe, zudem zwei von zehn Männchen der Gruppe MS. In der Kontrollgruppe überlebten alle Tiere bis einschließlich sieben Tage nach MCAO. Hervorgehoben wird der beschriebene nachteilige Effekt einer pränatalen GC-Therapie auf das funktionelle Outcome nach MCAO durch die Tatsache, dass keines der pränatal mit GC behandelten Tiere nach der MCAO motorisch unbeeinträchtigt war. Demgegenüber wiesen 17 % der weiblichen und 11 % der männlichen Kontrollen kein motorisches Defizit nach MCAO auf.

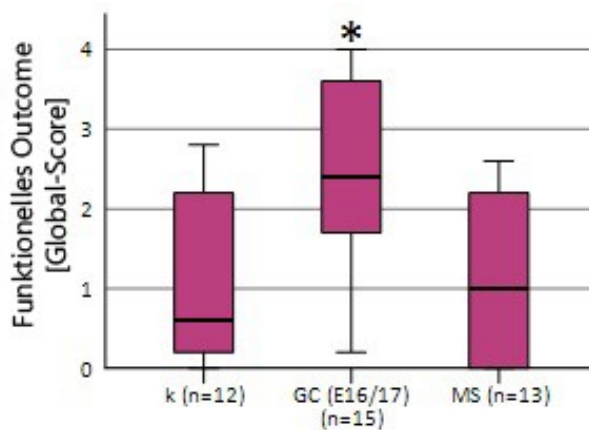


Abbildung 18: Motorisches Defizit der weiblichen Mäuse nach MCAO in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Die pränatale GC-Behandlung führt zu einer schwerwiegenderen motorischen Beeinträchtigung (* $p < 0,05$).

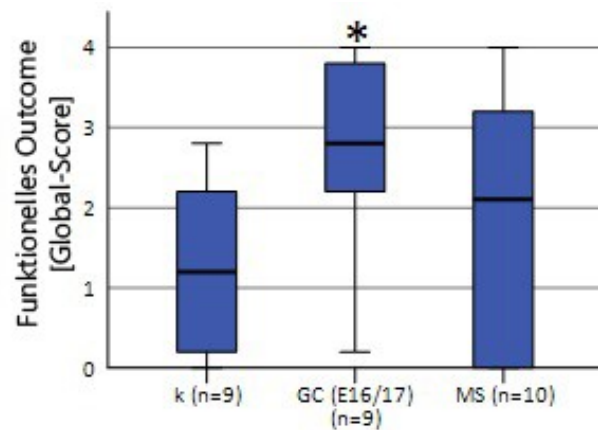


Abbildung 19: Motorisches Defizit der männlichen Mäuse nach MCAO in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Die pränatale GC-Behandlung führt zu einer schwerwiegenderen motorischen Beeinträchtigung (* $p < 0,05$).

Das Geschlecht schien im vorliegenden Experiment keinen Einfluss auf das funktionelle Outcome zu haben (Abbildung 20).

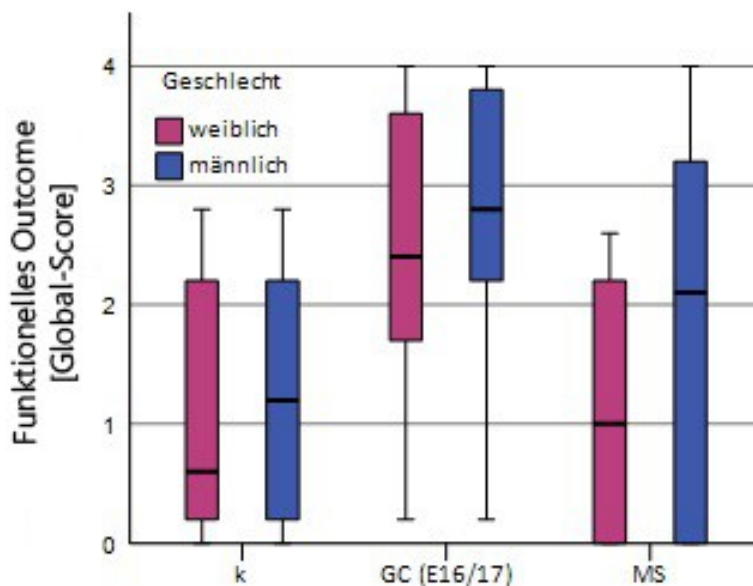


Abbildung 20: Motorisches Defizit nach MCAO in Abhängigkeit des Geschlechts. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation.

Keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern innerhalb der Gruppen.

5.4 Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf die Infarktgröße nach MCAO

Die Infarktgröße wurde als Anteil des Infarktes an der ipsilateralen Hemisphäre berechnet. Die durch die MCAO induzierten Hirninfarkte waren in allen Gruppen vor allem in Basalganglien, Hippocampus sowie im frontoparietalen Kortex lokalisiert, was dem Versorgungsgebiet der okkludierten A. cerebri media (MCA) entsprach.

Hemisphärenvolumen

Bei Tieren beider Geschlechter ergaben sich in keiner der Gruppe relevante Größenunterschiede zwischen der vom Infarkt betroffenen und der kontralateralen Hemisphäre (Abbildung 21). Damit war zum Zeitpunkt der Gewinnung der Hirnschnitte sieben Tage nach Schlaganfall kein relevantes Hirnödem zu konstatieren.

Auch zwischen Tieren mit pränataler GC sowie MS und den Kontrolltieren konnten keine Unterschiede im Volumen der vom Schlaganfall betroffenen Hemisphäre festgestellt werden (Abbildung 22), sodass der perinatale Stress keinen Einfluss auf das postischämische Ödem zu haben schien.

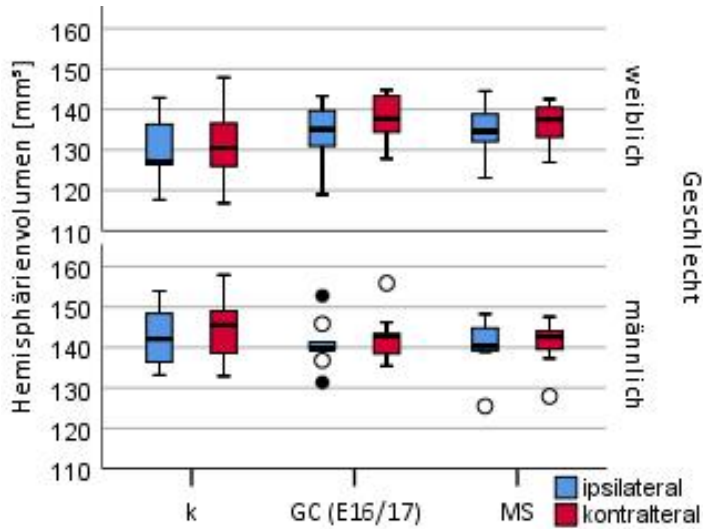


Abbildung 21: Vergleich der Volumina beider Hemisphären. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Es fand sich kein Größenunterschied der vom Infarkt betroffenen Hemisphäre gegenüber der kontralateralen Hemisphäre und somit kein Infarktödem sieben Tage nach MCAO.

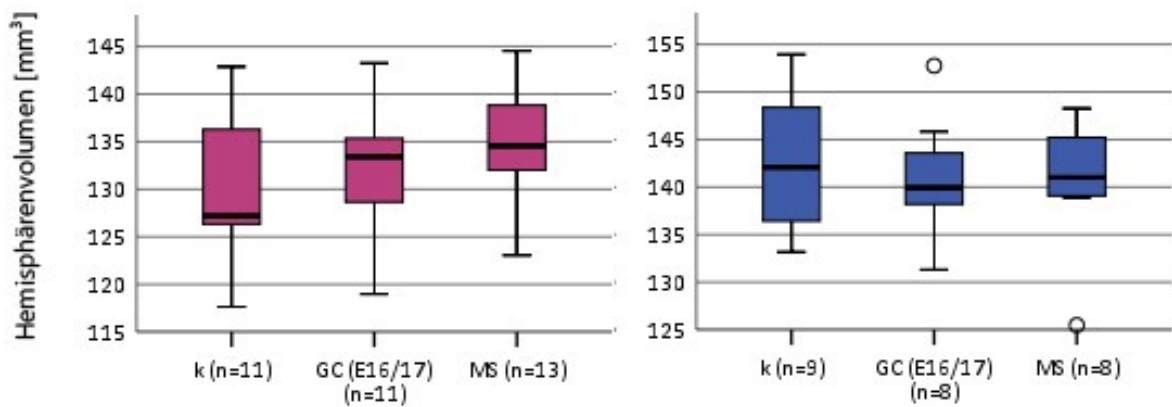


Abbildung 22: Volumen der vom Infarkt betroffenen Hemisphäre weiblicher (links) und männlicher Tiere (rechts) in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Kresylviolett-Färbung

Die CV-Färbung diente der Darstellung des Infarktkerns. In Abbildung 23 zeigt sich ein für den vorliegenden Versuch typischer Infarkt im Bereich des Striatums unter besonderer Beachtung von karyolytischen Zellkernstrukturen in Abbildung 24.

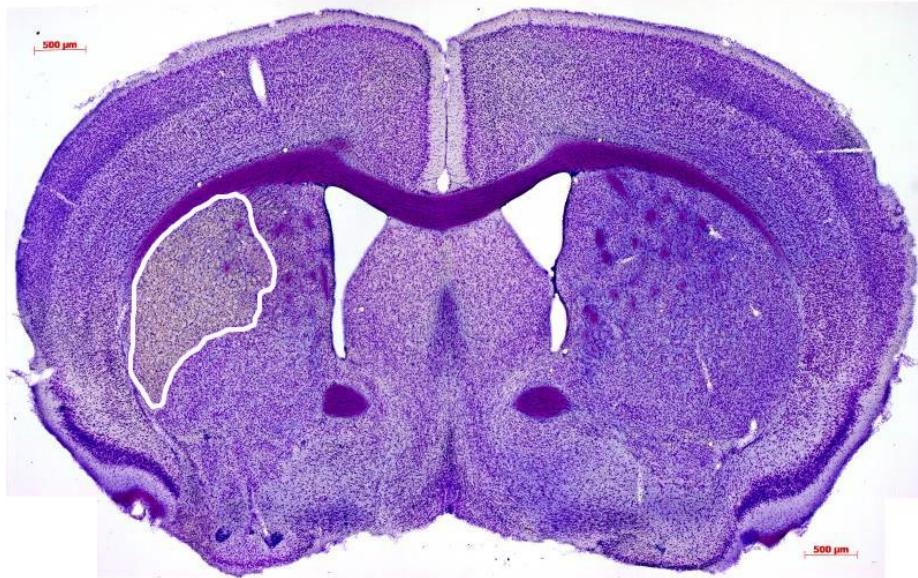


Abbildung 23: Beispiel für ein Infarktareal in der CV-Färbung (weiß umrandet).

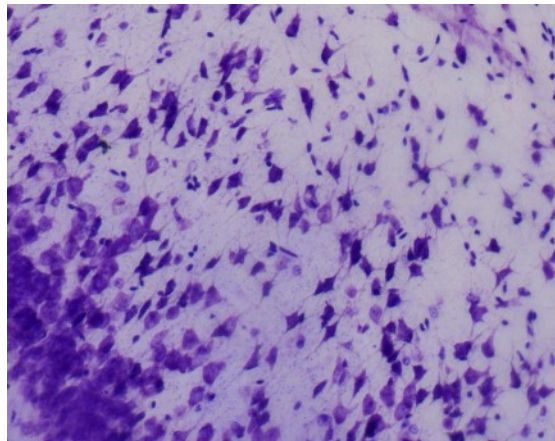


Abbildung 24: Vergrößerter Bildausschnitt des Infarktareals aus **Abbildung 23** mit geschrumpften, karyolytischen Zellkernen in der ischämischen Hemisphäre mit teilweise typischer Dreiecksform. Maßstab: 1 cm auf Abbildung entspricht 50 µm.

Sowohl bei den Weibchen als auch bei den Männchen hatten weder eine pränatale GC-Therapie noch eine MS Einfluss auf die Infarktgröße in der CV-Färbung (Abbildung 25 und Abbildung 26).

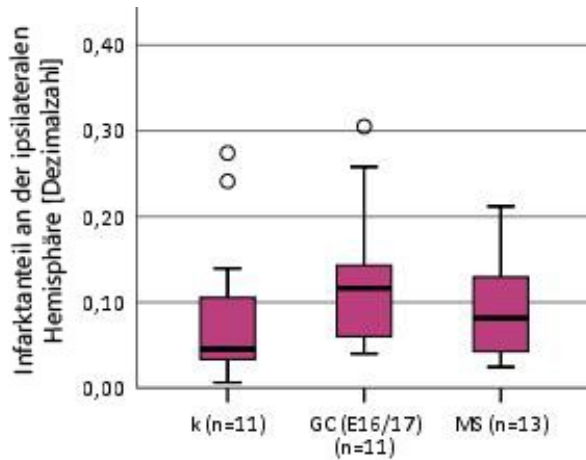


Abbildung 25: Relatives Infarktvolumen der weiblichen Tiere in der CV-Färbung in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

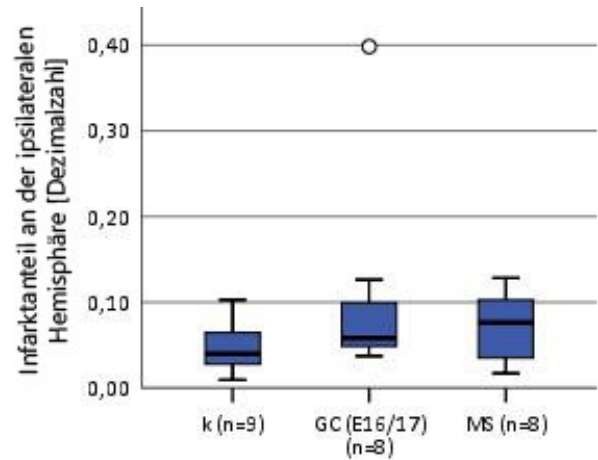


Abbildung 26: Relatives Infarktvolumen der männlichen Tiere in der CV-Färbung in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

MAP2-Färbung

Die MAP2-Färbung diente näherungsweise der Darstellung der Penumbra. In Abbildung 27 findet sich ein für die MAP2-Färbung stellvertretendes Infarktareal im medialen Striatum mit verminderter Immunreaktivität im Vergleich zur Gegenseite. Sowohl bei Weibchen als auch bei Männchen führte eine pränatale GC-Behandlung, nicht jedoch MS, zu größeren Infarkten in der CV-Färbung (Abbildung 28 und Abbildung 29).



Abbildung 27: Beispiel für ein Infarktareal in der MAP2-Färbung. Der Infarkt ist die Fläche mit verminderter Immunreaktivität für MAP2 (weiß umrandet).

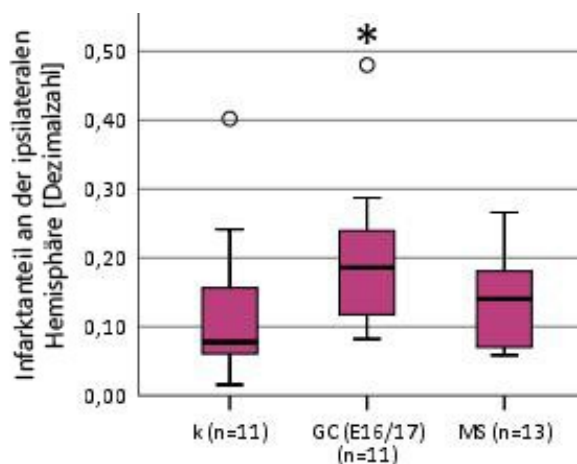


Abbildung 28: Relatives Infarktvolumen der weiblichen Tiere in der MAP2-Färbung in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Eine pränatale GC-Therapie führt zu größeren Infarkten (* $p < 0,05$).

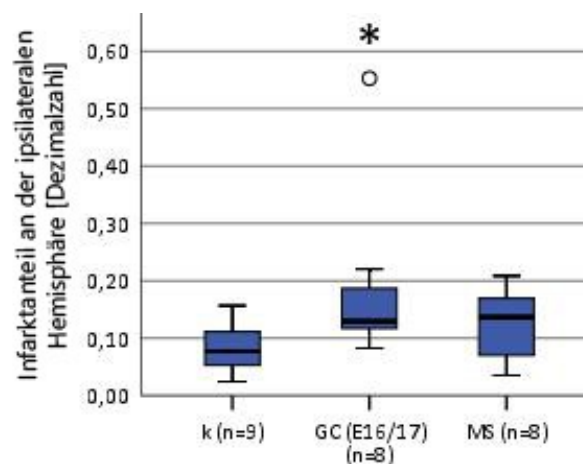


Abbildung 29: Relatives Infarktvolumen der männlichen Tiere in der MAP2-Färbung in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutterseparation. Eine pränatale GC-Therapie führt zu größeren Infarkten (* $p < 0,05$).

GFAP-Färbung

Die GFAP-Färbung illustrierte die astrozytäre Reaktion im zentralen Nervensystem nach Schlaganfall und entsprach damit näherungsweise der Infarktnarbe. In Abbildung 30 ist ein Areal mit vermehrter GFAP-Immunreaktivität im Striatum gezeigt, welches an den Infarktkern angrenzend lokalisiert ist. Sowohl bei Weibchen als auch bei Männchen hatten weder GC (E16/17) noch MS statistisch signifikanten Einfluss auf die Infarktgröße in der CV-Färbung (Abbildung 31, Abbildung 32).



Abbildung 30: Beispiel für ein Infarktareal in der GFAP-Färbung. Der Infarkt ist die im Vergleich dunklere, dem Infarktkern (innere weiße Umrandung) angrenzende Gliosezone mit höherer Immunreaktivität für GFAP (zwischen innerer und äußerer weißer Umrandung).

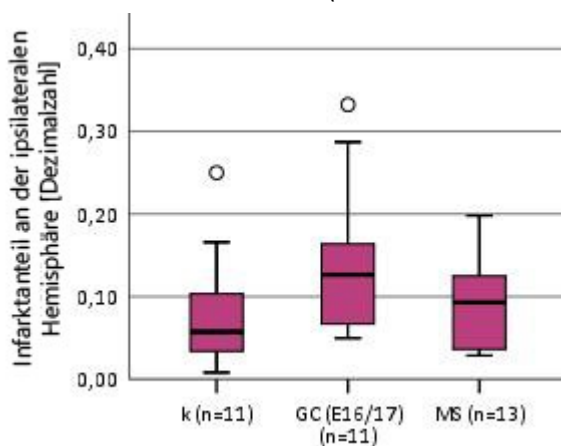


Abbildung 31: Relatives Infarktvolumen der weiblichen Tiere in der GFAP-Färbung in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/17) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutter-separation. Keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

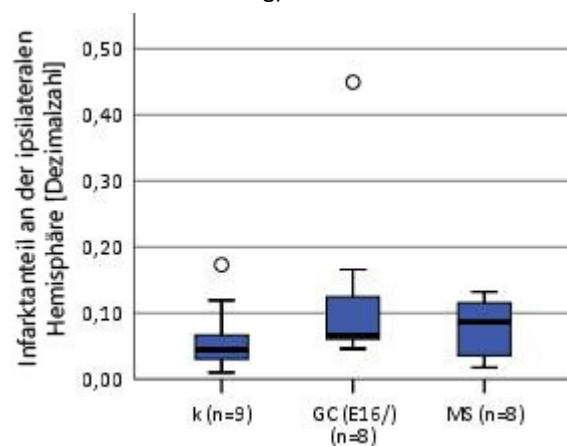


Abbildung 32: Relatives Infarktvolumen der männlichen Tiere in der GFAP-Färbung in Abhängigkeit des perinatalen Stressreizes. k = Kontrollgruppe, GC (E16/) = pränatale GC-Behandlung an den Tagen 16 und 17 der Gestation, MS = postnatale Mutter-separation. Keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Vergleich der Infarktgröße in den verschiedenen Färbungen

In Abbildung 33 ist die Infarktgröße in den drei verwendeten Färbungen CV, MAP2 und GFAP für die Kontrollgruppe, für die pränatal mit GC behandelten Tiere und für Tiere nach MS jeweils nach Geschlecht getrennt dargestellt. Der Infarkt kommt in der MAP2-Färbung in allen Gruppen tendenziell größere zur Darstellung als in CV- und GFAP-Färbung. Zwischen der Infarktgröße in CV- und GFAP-Färbung zeigt sich kein Unterschied.

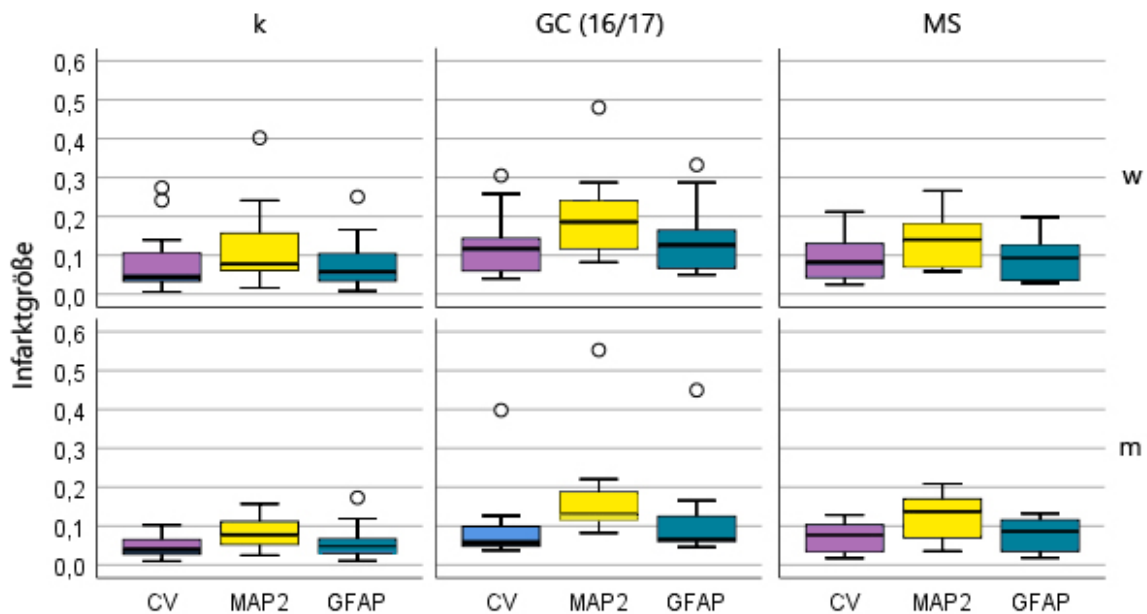


Abbildung 33: Vergleich der relativen Infarktgrößen (Anteil des Infarkt Volumens am ipsilateralen Hemisphärenvolumen) zwischen den drei verwendeten Färbungen. w= weiblich, m=männlich. Der Infarkt kommt in der MAP2-Färbung in allen drei Gruppen beider Geschlechter tendenziell größer zur Darstellung als in CV- und GFAP-Färbung.

6 DISKUSSION

6.1 Diskussion der Methoden

6.1.1 Die Maus als Versuchstier

Das verwendete experimentelle Modell mit einem Nagetier als Versuchstier bietet den Vorteil einer langen Erprobung und einer breiten Anwendung insbesondere in der Schlaganfallforschung (Dirnagl 2006). Sowohl für die Ratte als auch für die Maus existieren valide Modelle für fokale zerebrale Ischämien (Bederson et al. 1986, Engel et al. 2011), darüber hinaus auch solche für affektive Störungen wie die Depression (Dalvi und Lucki 1999, Cryan et al. 2005). Dennoch ergeben sich für das Nagetiermodell Einschränkungen in der Übertragbarkeit auf den Menschen. So ist beispielsweise das Alter der Tiere zum Untersuchungszeitpunkt ein wichtiger Faktor in der Interpretation der Ergebnisse. Im hier beschriebenen Versuchsaufbau wurde mit sechs bis neun Monate alten Mäusen der Rasse C57/Bl6 gearbeitet. Setzt man die Lebensspanne der Spezies von etwa zwei Jahren als Maßstab, entspricht dies einem ungefähren Alter zwischen 30 und 45 Jahren beim Menschen (Dutta und Sengupta 2016). Zwar wurde die zerebrale Ischämie im Rahmen dieser Arbeit durch MCAO experimentell induziert, die Antwort des juvenilen und des alten Gehirns der Maus darauf unterscheiden sich jedoch. So zeigten 18 Monate alte Mäuse im Vergleich zu zwei Monate alten Mäusen 30 Tage nach MCAO sowohl größere Infarkte als auch eine langsamere Erholung von motorischen Defiziten (Manwani et al. 2011). Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse sollte demnach das junge Erwachsenenalter der Mäuse Berücksichtigung finden.

Zudem bestehen zwischen verschiedenen Spezies relevante Unterschiede vor allem im Hinblick auf den Stand der Hirnreife zum Zeitpunkt der Geburt (Festing und Fisher 2000). Die Proliferation und Migration der Neuronen ist beim menschlichen Feten etwa mit der 24. Schwangerschaftswoche abgeschlossen – etwa dem Zeitpunkt der Schwangerschaft, ab dem eine pränatale GC-Therapie bei drohender Frühgeburt in der klinischen Praxis angewandt werden kann (Andersen 2003, Sweet et al. 2007). Der Entwicklungsstand menschlicher Feten zu diesem Zeitpunkt entspricht ungefähr dem einer sieben Tage alten Maus, deren Neuronenzahl sich zwischen Geburt und 16. Lebenstag noch einmal nahezu verdoppelt (Clancy et al. 2001, Lyck et al. 2007). Mit der Gabe von sGC an den Tagen E16 und 17, was einem späten Schwangerschaftszeitpunkt bei der Maus entspricht, wurde beim vorliegenden

Versuchsaufbau somit ein Kompromiss eingegangen zwischen einer Intervention innerhalb des Zeitraums der Hirnreifung der Maus und einer Behandlung der Mutter, um der pränatalen GC-Therapie beim Menschen möglichst ähnlich zu sein. Aus den Betrachtungen lässt sich jedoch schließen, dass nicht nur eine pränatale Intervention, sondern auch ein postnataler Stressreiz bei der Mause eine fetale Programmierung hervorrufen kann, da das Nagergehirn auch noch postnatal reift.

6.1.2 Perinatale Glucocorticoid- oder Stressexposition

Wahl des verwendeten Medikaments zur pränatalen Glucocorticoid-Therapie

Die unterschiedliche Wirkung verschiedener sGC untereinander wie dem in diesem Experiment verwendeten DM auf die sich in Reifung befindliche HHN-Achse hängt von vielen Faktoren ab. Beispielsweise ist die biologische Halbwertszeit von sGC deutlich länger als die des körpereigenen CORT (Czock et al. 2005). Auch binden sGC wie BM und DM im Vergleich zu CORT mit einer höheren Affinität an GR, welcher die programmierenden Effekte auf die HHN-Achse maßgeblich vermittelt (Kapoor et al. 2008). CORT bindet erst in supraphysiologischen Konzentrationen an den GR (de Kloet et al. 1987). Die höhere Rezeptoraffinität von sGC im Vergleich zu CORT ist somit ein möglicher Grund dafür, dass sGC einen stärker programmierenden Effekt auf die HHN-Achse haben als psychologischer Stress in der Schwangerschaft. DM und BM durchdringen bei erwachsenen Säugern die Blut-Hirn-Schranke im Normalfall nicht, weil diese mit dem multidrug resistance protein 1a p-Glykoprotein über einen Transporter verfügt, der sGC im Gegensatz zu CORT am Übertritt ins zentrale Nervensystem hindert (De Kloet et al. 1998, Meijer et al. 1998). Beim Feten und vermutlich auch noch bis in postnatale Zeiträume hinein gelangen hingegen wirksame Mengen an sGC ins Gehirn, da die Blut-Hirn-Schranke pränatal noch in Reifung begriffen ist (Ballabh et al. 2004, Matthews 2001). Da sich jedoch weder die in Frage kommenden sGC in der Eigenschaft der Durchgängigkeit der Blut-Hirn-Schranke wesentlich unterscheiden, noch relevante Unterschiede im Reifegrad der Blut-Hirn-Schranke innerhalb der pränatalen Entwicklungsphase bestehen, in welcher die pränatale GC-Therapie sowohl beim Menschen als auch in unserem Versuch angewandt wird, spielten diese Überlegungen in der Auswahl des verwendeten sGC eine untergeordnete Rolle.

Mutterseparation

Der in diesem Experiment applizierte Stressreiz MS ist ein häufig verwendeter Stressreiz, um im Nagermodell die fetale Programmierung insbesondere der HHN-Achse zu untersuchen (Bailoo et al. 2014, Biagini et al. 1998, Marais et al. 2008). Werden Nager in den ersten beiden Lebenswochen innerhalb der sogenannten Stress-hyporesponsiven Periode (SHRP), während derer ein Stressreiz im Vergleich zu einem späteren Applikationszeitpunkt eine gedämpfte Reaktion der HHN-Achse hervorruft, von der Mutter vereinzelt, so kann dies im späteren Leben eine überschießende oder eine gedämpfte Stressantwort vermitteln (Levine 1994, Aisa et al. 2008, Lajud et al. 2012). Die Richtung und die Intensität des programmierenden Effekts der MS auf die HHN-Achse hängen dabei unter anderem vom Zeitpunkt sowie von Dauer und Frequenz der Applikation ab.

Zeitpunkt: Dass die Intensität des Einflusses von MS auf die HHN-Achse abhängig davon ist, wann diese postnatal angewendet wird, könnte auf unterschiedliche Zeitfenster der Stress-hyporesponsiven Periode von verschiedenen Nagerspezies zurückzuführen sein. So reicht die SHRP bei Ratten etwa von P4 bis P14 und bei Mäusen von P1 bis P12 (Levine et al. 1991, Schmidt et al. 2003). Bei Mäusen steigt ab P12 die basale Aktivität der HHN-Achse wieder an und die Reaktion auf Stressreize entspricht ab diesem Zeitpunkt nunmehr der erwachsener Tiere (Schmidt et al. 2003). Zwar zeigten einige Studien, dass MS in der Mitte der SHRP einen intensiveren programmierenden Effekt auf HHN-Achse und Verhalten im späteren Leben hatte als eine Applikation für jeweils wenige Tage zu deren Beginn. Die MS wurde im hier vorgestellten Versuchsaufbau jedoch von P4 bis P14 angewendet, sodass durch die Applikation über insgesamt 11 Tage davon ausgegangen werden kann, dass sie innerhalb der SHRP lag.

Dauer und Frequenz: Auch die Zeitdauer der MS hat einen entscheidenden Einfluss auf den späteren Phänotyp. Während eine kurzzeitige MS von 15 min täglich an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen potenziell zu einer hyporesponsiven HHN-Achse im späteren Leben führt, hat eine mehrstündige MS beziehungsweise sogar der vollständige Verlust an Zuwendung für mehrere aufeinanderfolgende Tage meist eine verstärkte Aktivität der Stressachse zur Folge (de Kloet et al. 2005b, Guijarro et al. 2007). Die Programmierung einer gedämpften HHN-Achse wird in diesem Kontext darauf zurückgeführt, dass das Muttertier nach der Rückkehr des Jungen eine verstärkte mütterliche Zuwendung zeigt, was über niedrigere CORT-Spiegel beim Jungtier zu einer andauernden Hochregulation der GR im

Hippocampus und so zu einem zeitlebens verstärkten Feedback-Mechanismus führt (Lehmann und Feldon 2000, de Kloet et al. 2005a, Guijarro et al. 2007, Plotsky und Meaney 1993). Eine länger andauernde Abwesenheit der Mutter bedeutet hingegen einen Verlust an Brutpflege und an diese stressreiche Umgebung passt sich das Jungtier mit einer zeitlebens hyperresponsiven HHN-Achse an (de Kloet et al. 2005b, Lehmann und Feldon 2000).

Neben der Spezies, dem Zeitpunkt und der Dauer der MS stellen die Haltung während der Abwesenheit der Mutter und das Geschlecht weitere abhängige Faktoren dar (de Kloet et al. 2005b). Die uneinheitlichen Protokolle machen eine Interpretation der sehr heterogenen Ergebnisse von Untersuchungen in Bezug auf die MS schwierig (Tractenberg et al. 2016).

6.1.3 Akuter Immobilitätsstress als Modell für Kurzzeitstress

Mit einem Restrainer, der keine (Flucht)-Bewegung des Tieres zulässt, wurde in diesem Versuch eine standardisierte Stressreaktion erzeugt. Die zwanzigminütiger Immobilisation war in unserem Versuch zuverlässig in der Lage, die CORT-Basalkonzentration im Serum der Mäuse unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit auf das Zwei- bis Vierfache zu steigern, was sich mit den Literaturangaben deckt (Armario und Castellanos 1984). Die Methode bietet den Vorteil der einfachen und kostengünstigen Durchführbarkeit und zieht, wenn sie lediglich einmal pro Tier durchgeführt wird, keine Gewöhnung nach sich, da zum einen kein Lerneffekt entsteht und dem Tier zum anderen keine Möglichkeit geboten wird, den Stressor abzuschwächen (Buynitsky und Mostofsky 2009).

Der Restrainer-Stress birgt den Nachteil einer möglichen Habituation innerhalb des Versuchs (Glavin et al. 1994). Dauert der Stressreiz anders als im hier dargestellten Experiment länger als 30 min an, lässt die Antwort der HHN-Achse in der Regel bereits während der Stressreaktion wieder nach, sodass der gemessene CORT-Peak-Wert falsch-niedrig erscheint (Buynitsky und Mostofsky 2009). Aus diesem Grund wurde im vorliegenden Versuchsaufbau die Zeitdauer von 20 Minuten gewählt.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der bei der Forschung zu Stressreaktionen bei Nagern betrachtet werden muss, ist die Tageszeit, zu der der Stressreiz appliziert wird. Zwar sind Mäuse im Gegensatz zum Menschen nachtaktive Tiere, deren physiologischer CORT-Peak gegen Abend auftritt, jedoch zog in frühen Arbeiten zur zirkadianen Rhythmik der HHN-Achse eine Stressreaktion am Morgen und am Abend eine gleichermaßen intensive CORT-Antwort nach sich (Buckley und Schatzberg 2005, Zimmermann und Critchlow 1967). Auch da unser

Versuchsaufbau ein enges Zeitfenster für die Applikation des Immobilitätsstressreizes von drei Stunden ermöglichte und damit ähnliche Voraussetzungen für alle Tiere und somit ein systematischer Fehler in Bezug auf den Einfluss der zirkadianen Rhythmik angenommen werden können, war es vertretbar, die Versuche am Vormittag während der eigentlichen Ruhephase der Tiere durchzuführen.

6.1.4 Der Schwanzhalteversuch zur Quantifizierung depressiven Verhaltens

Zur Beurteilung des depressiven Verhaltens wurde mit dem Schwanzhalteversuch ein Test verwendet, welcher seit den 1980er Jahren in präklinischen Studien von antidepressiven Substanzen etabliert ist und die Immobilität als Indikator von depressivem Verhalten in einer Situation ohne Fluchtmöglichkeit objektiviert (Steru et al. 1985). Der in der Aussage über depressives Verhalten dem Schwanzhalteversuch ähnelnde Forced Swimming Test birgt gegenüber ersterem bei der Anwendung an Mäusen Nachteile. Zum einen weisen die Resultate bei nicht behandelten Tieren eine größere Streuung auf (Bogdanova et al. 2013). Zum anderen stellt die thermische Irritation durch das kalte Wasser einen zusätzlichen Stressreiz und dar und führt bisweilen sogar zu einer relevanten Hypothermie bei Mäusen (Porsolt et al. 1979, Cryan et al. 2005). Eine Weiterentwicklung beider Tests ist die isolierte Betrachtung der Kopfbewegung, welche bei depressiven Tieren in geringerem Maße zu beobachten ist und durch Serotonin-Wiederaufnahmehemmer wie Sertralin im Nagetiermodell gesteigert werden kann (Lockridge et al. 2013). Sie kann durch Agonisten und Antagonisten am 5-HT₂-Rezeptor gezielt beeinflusst werden, was einen Fortschritt in der präklinischen Erforschung antidepressiver Medikamente darstellt (Lockridge et al. 2013).

Beobachtungen, dass Mäuse der Rasse C57BL/6, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurden, ungeeignet für den Schwanzhalteversuch seien, da sie sich in bis zu 70% mit den Vorderläufen am eigenen Schwanz hochzogen (Mayorga und Lucki 2001), konnte im vorliegenden Experiment nicht bestätigt werden. Ein solches Verhalten zeigte sich im in Kapitel 4.5 vorgestellten Versuchsaufbau in weniger als 5 % der Fälle.

6.1.5 Die Okklusion der A. cerebri media als Schlaganfallmodell

Beim Menschen lassen sich Schlaganfälle in wenige klinische Subtypen einteilen, welche sich in Ätiologie, Bildgebung und Therapie beziehungsweise Ansätze in der Sekundärprophylaxe unterscheiden (Adams et al. 1993). Um fokale Ischämien im Tierversuch abzubilden, existieren mehrere Modelle, deren Auswahl sorgfältig im Hinblick auf die Ziele des Experiments

getroffen werden sollte. Da das vorliegende Versuchsprotokoll auch eine Evaluation des funktionellen Outcomes nach Schlaganfall vorsah, kamen eine (Hemi-)Kraniektomie erfordernde Varianten mit transtemporalem Zugangsweg nicht in Betracht, da eine solche Intervention die im postoperativen Zeitfenster geplanten motorischen Tests nicht zugelassen hätte (Kanemitsu et al. 2002, Tamura et al. 1981). Die von Tamura beschriebene distale Gefäßokklusion, welche ebenfalls eine Kraniektomie vorsieht, hat indes den Vorteil, dass kleinere Hypoxieareale entstehen, welche eher den Schlaganfällen beim Menschen ähneln (Carmichael 2005, Tamura et al. 1981). Eine weitere Methode der Schlaganfallinduktion ist die des photochemisch induzierten Infarktes (Dietrich et al. 1986, Watson et al. 1985). Sie ist wenig invasiv, stereotaktisch hinsichtlich der zu lädierenden Hirnareale planbar und bietet die Möglichkeit, elektrophysiologische Vorgänge im Areal gezielt zu untersuchen (Hagemann et al. 1998, Carmichael 2005). Durch die Ausbildung eines sowohl intra- als auch extrazellulären Ödems ist die photochemisch induzierte Ischämie jedoch in ihrer Pathophysiologie eher mit einer traumatischen Hirnschädigung zu vergleichen als mit einer fokalen Ischämie beim Menschen, wo eher das zytotoxische Ödem dominiert (Carmichael 2005). Auch eine Reperfusion wird in diesem Modell nur ungenügend simuliert (Carmichael 2005).

Im vorliegenden Experiment wurde sich letztlich für eine intraluminale Okklusion der MCA mit einem silikonbeschichteten Faden entschieden. Eine Kraniektomie sieht das Operationsprotokoll nicht vor (Clark et al. 1997). Es birgt charakteristische unerwünschte Effekte wie Subarachnoidalblutungen [in bis zu 8 % der Fälle (Schmid-Elsaesser et al. 1998b)] oder eine vorzeitige Reperfusion [in bis zu 26 % der Fälle (Schmid-Elsaesser et al. 1998b)], welche auch von der Verwendung eines Fadens ohne oder mit Silikonspitze abhängig sind (Schmid-Elsaesser et al. 1998a). Eine Aussage über die Inzidenz von Subarachnoidalblutungen kann für das vorliegende Experiment nicht getroffen werden, da eine Obduktion der vorzeitig verstorbenen Tiere nicht erfolgte. Geht man hypothetisch davon aus, dass sowohl die beiden perioperativ verstorbenen als auch die sieben innerhalb der sieben Tage nach MCAO verstorbenen Tiere eine Subarachnoidalblutung erlitten haben, so würde dies eine Komplikationsrate der MCAO in Bezug auf eine letale Blutung von 12,7 % bedeuten, die jedoch in Wirklichkeit niedriger sein dürfte, da innerhalb der verstorbenen Tiere auch ein großer Infarkt oder eine Infektion als Todesursache in Frage kommen.

Das Fadenmodell erlaubt die gezielte Okklusion eines Gefäßes anhand der gewählten Fadendicke, eine variable Ischämiezeit und die adäquate Reperfusion des MCA-Stromgebietes

(Braeuninger und Kleinschnitz 2009). Dabei besteht eine Abhängigkeit der Infarktgröße von der Okklusionsdauer. Längere Okklusionszeiten führten zu größeren Schlaganfällen (Engel et al. 2011, Carmichael 2005, Belayev et al. 1999). Eine dreißigminütige Ischämiezeit bei C57Bl/6-Mäusen ist laut Literatur in der Lage, einen Infarkt von einer Größe von 10 - 40% der betroffenen Hemisphäre (gemessen nach 24 Stunden Reperfusionzeit) zu verursachen (Carmichael 2005). Die von uns ermittelten Infarkte in der Kontrollgruppe waren kleiner (Median ca. 7%). Auffällig ist außerdem, dass die Infarkte in vorliegendem Experiment zumeist kortikal im Striatum gelegen waren. Diese Lokalisation kann damit erklärt werden, dass nach Reperfusion der Cortex eher wieder einen normalen zerebralen Blutfluss erlangt als die Basalganglien, in denen auch in unseren Versuchen häufig der Infarktkern lokalisiert war (Takagi et al. 1995).

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit ein klinisches Modell einer zerebralen Ischämie genutzt, das sowohl eine Reperfusion als auch die sekundäre Entzündungsreaktion berücksichtigte. Dabei waren sowohl Infarktgröße als auch das funktionelle Outcome mit der Literatur vergleichbar.

6.1.6 Motorische Tests zur Beurteilung des funktionellen Outcomes

Die im vorliegenden Experiment durchgeführten motorischen Tests zur Evaluierung des funktionellen Outcomes nach MCAO wurden zwei Arbeiten entlehnt, welche ursprünglich Ratten als Versuchstiere beinhalteten (Bederson et al. 1986, Hernandez und Schallert 1988).

Der Score nach Bederson ist ein etabliertes Instrument zur Beurteilung motorischer Defizite nach zerebraler Ischämie im Nagelmodell (Bederson et al. 1986). Er ist schnell und einfach zu erheben, weist jedoch Einschränkungen auf. So sind die beinhalteten Tests in ihrer Bewertung subjektiv (Schaar et al. 2010). Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde der Bederson-Score von ein und demselben Experimentator erhoben, um eine vergleichbare Beurteilbarkeit zu gewährleisten. Er wurde um die Resultate des Gridwalk-Tests und das Schlaganfall-Outcome „Versterben“ zur Zielgröße Global-Score erweitert, deren Herleitung in Kapitel 4.7.3 erläutert wurde. Der Gridwalk-Test, neben dem Bederson-Score als zweiter Bestandteil des Global-Scores, ist anhand der Auszählung der Trittfehler auf einem Lochgitter unter freier Exploration in der Lage, die feinmotorische Funktion, welche nötig war, um das Gitter ohne Fehler zu überqueren, abzubilden. Die videoassistierte Auswertung des Tests erfolgte unter Auszählung der absoluten Trittfehler während der Versuchsdauer von zwei Minuten. Auf eine

seitengetrennte Auswertung der Trittfehler wurde verzichtet, da dies eines aufwendigeren Versuchsaufbaus mit mehreren Kameras bedurft hätte, um verschiedene Perspektiven auf das Lochgitter zu gewinnen. Diese Anordnung hätte zudem neben einem erhöhten Personalaufwand einen vermehrten akustischen Stress durch Bedienung der Geräte nach sich gezogen. Auch mit der Berücksichtigung der absoluten Trittfehler konnte ein hinreichend guter Eindruck über die motorischen Defizite nach Schlaganfall gewonnen werden, was sich auch darin widerspiegelt, dass die Ergebnisse des Gridwalk-Tests positiv mit denen des Bederson-Scores korrelierten.

Vor MCAO besaßen alle Tiere die niedrigste Ausprägung im Global-Score, waren demnach ohne relevantes neurologisches Defizit. Nach fokaler Ischämie entfiel dieses fehlende Defizit im Global-Score auf 9 von 75 Tieren (12 %; nur den Bederson-Score einbezogen, sogar auf 32 % der Tiere). Tiere mit gutem funktionellen Outcome wiesen einen kleineren Schlaganfall auf. Global-Score und Infarktgröße korrelierten positiv. Sehr kleine Infarktareale könnten auf eine vorzeitige Reperfusion bei der MCAO-Operation dieser Mäuse zurückzuführen sein. Die Differenz von 34 % zu 16 % der Tiere, welche nur im Gridwalk-Test ein Defizit aufwiesen (nicht jedoch im Bederson-Score), zeigte, dass der Score nach Bederson vornehmlich schwerwiegende motorische Defizite detektiert. Diese Interpretation wird durch die Beobachtung gestützt, dass es nur wenige Tiere gab, die ein Defizit im Bederson-Score aufwiesen, jedoch keines im Gridwalk-Test (8 %). Das Erfordernis der Kombination beider Tests ergibt sich zuletzt daraus, dass es Tiere gab, die zwar noch im Bederson-Score bewertet werden konnten, im Gridwalk-Test aufgrund des neurologischen Defizits aber einen Versuchsabbruch verzeichneten. Beim in der vorliegenden Arbeit verwendeten Test zur Quantifizierung des Outcomes nach MCAO wurde zudem analog zur modifizierten Skala nach Rankin das Versterben als schlechtestes Outcome-Ereignis nach Schlaganfall berücksichtigt. Auf diese Weise konnten 10 % mehr Tiere in die Auswertung eingeschlossen werden als nur mit dem Bederson-Score, durch den die vorzeitig verstorbenen Tiere nicht repräsentiert gewesen wären.

Insgesamt konnte mit dem Global-Score eine sehr feine Differenzierung motorischer Defizite getroffen werden, die zudem gut mit der bestimmten Infarktgröße in allen verwendeten Färbungen korrelierte. Dies könnte Eingang in zukünftige Arbeiten finden, die beispielsweise einen Langzeitverlauf des Schlaganfall-Outcomes zum Gegenstand haben. Durch den Verzicht auf aufwendige histologische Verfahren zugunsten des Global-Scores könnte somit der Einsatz

an Versuchstieren reduziert werden, da für die Gewinnung von Hirnschnitten zur histologischen Untersuchung ein Töten der Tiere nötig ist, zur Erhebung des Global-Scores jedoch nicht.

6.1.7 Verwendete Färbungen zur Darstellung des Hirninfarktes

Kresylviolett-Färbung

Kresylviolett (CV) bindet, wie in Kapitel 4.8.1 beschrieben, als basischer Farbstoff an saure, RNA-reiche Strukturen des Zellkerns wie Ribosomen, die auch als Nissl-Schollen bezeichnet werden (Alvarez-Buylla et al. 1990). Da in Folge einer Minderperfusion des Gehirns und der damit einhergehenden Hypoxie die Ribosomen zu Grunde gehen, erscheinen infarzierte Areale in der CV-Färbung heller als intakte Zellen (Tureyen et al. 2004). Sie sind somit, wie auch im vorliegenden Versuch gezeigt werden konnte, verlässlich von nicht angefärbtem Gewebe zu unterscheiden. Der durch die CV-Färbung visualisierte Bereich, in dem Neuronen durch eine zerebrale Ischämie auf die beschriebene Weise strukturell geschädigt sind, kann in Abgrenzung zur Penumbra (Regionen mit gestörtem Metabolismus, aber noch intakter Zellstruktur) mit dem Infarktkern gleichgesetzt werden (Liu et al. 2009, Popp et al. 2009).

MAP2-Färbung

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) ist ein zytoskelettaler Marker, der sich im reifen Gehirn von Nagern im Bereich der Dendriten von Neuronen findet (Dawson und Hallenbeck 1996, De Camilli et al. 1984). Ist seine Anfärbbarkeit, also die Reaktivität eines entsprechenden Antikörpers mit dem Molekül, nach einer zerebralen Ischämie vermindert, so kann dies als Marker für geschädigte, aber noch nicht untergegangene Neuronen herangezogen werden (Kitagawa et al. 1989). Dies leitet sich daraus ab, dass MAP2 im ZNS einem schnellen Proteinumsatz unterliegt, wodurch das Protein bereits in einer frühen postischämischen Phase nur noch vermindert nachweisbar ist, da sein Abbau sehr rasch geschieht und seine Synthese letztlich zum Erliegen kommt, noch bevor der Zelltod eintritt (Sanchez et al. 2000). Eine verminderte Immunreaktivität für MAP2 nach einem ischämischen Schlaganfall korreliert mit einem erhöhten Glukoseumsatz in Neuronen, der einen gestörten Stoffwechsel von Mitochondrien im Falle einer Hypoxie anzeigt (Gilland et al. 1998, Kitagawa et al. 1989). Ob Neuronen im Rahmen eines Schlaganfalls sofort oder erst im Rahmen eines sekundären Zellschadens bei fortdauernd ausbleibender Sauerstoff-versorgung untergehen, hängt maßgeblich vom zerebralen Blutfluss ab, der wiederum erst ab einer bestimmten Minderung

einen erhöhten Glukoseumsatz in den Nervenzellen zu Folge hat (Paschen et al. 1992). Die Schwelle des zerebralen Blutflusses, unterhalb derer die Neuronen im Sinne einer Anpassung an den Sauerstoffmangel einen gesteigerten Glukosemetabolismus zeigen, ist höher als diejenige, unterhalb derer ATP als Energieträger nicht mehr hinreichend bereitgestellt werden kann, was den Zelltod zu Folge hat (Paschen et al. 1992). Die Größe der Penumbra, die Areale von geschädigten, aber noch nicht untergegangenen Neuronen anzeigt und wie beschrieben näherungsweise mit der MAP2-Färbung dargestellt werden kann, ist demnach abhängig vom Grad des Blutflusses während Okklusion und Perfusion in der betroffenen Hirnregion (Schwab et al. 1998, Hossmann 2006).

Den vorangegangenen Erläuterungen folgend, sollte das Areal mit verminderter MAP2-Immunreaktivität nach einer MCAO größer sein als dasjenige des Infarktkerns, der durch die CV-Färbung repräsentiert wird, da es neben der Penumbra auch den Infarktkern einschließt (Popp et al. 2009). Dies bestätigte sich im hier gezeigten Versuch (siehe Kapitel 5.4). Zudem war die MAP2-Färbung zuverlässig in der Lage, bei allen Tieren den Infarkt nach MCAO anzufärben, und erwies sich demnach mit dem in Kapitel 4.8.2 aufgeführten Protokoll als sehr valide Methode.

GFAP-Färbung

Wie in Kapitel 2.5 erläutert wurde, kommt im Rahmen einer nach einer zerebralen Perfusionstörung nach dem initialen nekrotischem Zelltod durch Gewebhypoxie eine sekundäre Immunantwort mit Einwanderung immunaktiver Zellen in Gang, die unter anderem den apoptotischen Untergang von Neuronen in dem Infarkt angrenzenden Arealen initiiert (Dirnagl et al. 1999, Wang et al. 2007). Dabei spielen Astrozyten eine wichtige Rolle, die in Antwort auf den Gewebsschaden hypertrophieren und unter anderem die Ionen- und Wasserhomöostase nach zerebraler Ischämie regulieren, die extrazelluläre Konzentration des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat senken und pro- sowie antiinflammatorische Zytokine ausschütten (Kawano et al. 2012). Die Aktivierung der Astrozyten geht dabei innerhalb des ersten Tages nach zerebraler Ischämie mit einer Hochregulation des sauren Gliafaserproteins (GFAP) als Bestandteil des Zellgerüsts von Astrozyten einher (Kawano et al. 2012). Dieser Prozess, in dem ruhende Astrozyten in Folge einer verminderten Perfusion im Gehirn in einen aktiven Zustand versetzt werden, wird als reaktive Astroglie und der resultierende Gewebsschaden als Infarktnarbe bezeichnet (Sofroniew 2009). Diese konnte im

vorliegenden Experiment durch eine verstärkte Immunreaktivität von GFAP mit einem entsprechenden Antikörper zuverlässig visualisiert werden.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Dem folgenden Kapitel soll zur besseren Übersicht eine Tabelle vorangestellt werden, welche die wichtigsten Ergebnisse der verschiedenen Versuchsteile kurz zusammenfasst.

Gruppe und Geschlecht		Aktivität der HHN-Achse	Depressivität	Infarktgröße und motorisches Defizit nach MCAO
GC (E16/17)	weiblich	↑	↑	↑
	männlich	=	↑	↑
MS	weiblich	↑	=	=
	männlich	=	↑	=

Tabelle 4: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Gruppen GC (E16/17) (pränatale GC-Therapie an den Tagen 16 und 17 der Gestation) sowie MS (Mutterseparation an den Tagen P4 bis P14 nach der Geburt) gegenüber der weiblichen bzw. männlichen Kontrollgruppe in den drei Versuchsteilen (siehe Kapitel 5). Das Symbol „↑“ weist auf einen Effekt der jeweiligen Intervention hin. Das Symbol „=“ zeigt an, dass kein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe besteht.

6.2.1 Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf die Aktivität der HHN-Achse

Pränatale Glucocorticoid-Therapie

Die Aktivität der HHN-Achse wurde im Alter von sechs Monaten im Rahmen einer standardisierten, zwanzigminütigen Immobilitätsstress-Situation beurteilt (siehe Kapitel 4.4). Daraus ging hervor, dass eine pränatale GC-Therapie an den Tagen E16 und E17 bei weiblichen, nicht jedoch bei männlichen Tieren, eine überschießende Stressantwort programmierte. Dies deckt sich mit den Literaturangaben, denn Nagern wird in Folge einer pränatalen Gabe DM im späteren Leben eine hyperresponsive HHN-Achse zugeschrieben (Bakker et al. 1995). Sind die Feten in einem vulnerablen Zeitfenster (bei Nagern in der letzten Schwangerschaftswoche) exzessiven GC-Spiegeln oder sGC ausgesetzt, so führt das zu einer verminderten Expression von GR und MR bereits pränatal, was eine Störung des negativen Feedback-Mechanismus der HHN-Achse zur Folge hat (Noorlander et al. 2006). Dass auch bei drei Monate alten Ratten nach pränatalem Stress noch eine Herunterregulierung von MR und GR im Hippocampus zu beobachten war, ist eine mögliche Erklärung für die auch im Erwachsenenalter persistierend überschießende Stressachse im vorliegenden Experiment und spricht für einen langfristigen, programmierenden Effekt (Henry et al. 1994).

Der aktuelle Kenntnisstand insbesondere in Bezug auf die geschlechtsspezifische Wirkung einer pränatalen GC-Gabe wird durch unser Experiment vertieft und erweitert, da Weibchen

und Männchen ein analoges Versuchsprotokoll durchliefen und damit anders als in vielen anderen Studien, in denen lediglich ein Geschlecht untersucht wurde, ein unmittelbarer Vergleich von Weibchen und Männchen möglich ist.

Die in den vorliegenden Experimenten nachweisbare geschlechtsspezifische Wirkung einer pränatalen GC-Behandlung hinsichtlich der Programmierung einer hyperresponsiven HHN-Achse deckt sich mit der aktuellen Studienlage (Weinstock 2007). So führte im Rattenversuch akustischer (Weinstock et al. 1992) beziehungsweise Immobilitätsstress (Szuran et al. 2000) während der letzten Schwangerschaftswoche bei sechs beziehungsweise zwölf Monate alten, weiblichen Nachkommen zu einer hyperresponsiven HHN-Achse, wohingegen Männchen des selben Alters keine veränderte Stressachse boten. Allerdings ist bezüglich männlicher Tiere die Studienlage nicht eindeutig (Weinstock 2007). So fanden sich in weiteren Studien, deren Protokolle jedoch im Hinblick auf verwendete Spezies, Art des pränatalen Stressors, Zeitpunkt der Applikation und das Alter der Tiere heterogen sind, bei adulten männlichen Tieren sowohl Hinweise für eine verminderte (Liu et al. 2001, McCormick et al. 1995) als auch für eine gesteigerte Reaktivität der HHN-Achse (Koehl et al. 1999, Henry et al. 1994). Einen Effekt auf die Entwicklung der HHN-Achse scheint pränataler Stress bei männlichen Nagern erst bei intensiverem vorgeburtlichen Stressoren zu haben, wohingegen bei weiblichen Nachkommen, nicht jedoch bei Männchen, bereits einmal täglich applizierter Immobilitätsstress während der letzten Gestationswoche zu einer verstärkten CORT-Antwort auf akuten Stress führt (Gobinath et al. 2014). Dies könnte auch die selektive Wirkung einer pränatalen GC-Therapie auf die Weibchen in unserem Experiment erklären, bei dem eine höhere Dosis oder ein längerer Behandlungszeitraum möglicherweise auch Auswirkungen auf die HHN-Achse der Männchen gehabt hätte.

Die geschlechtsabhängig unterschiedliche Auswirkung von pränatalen Stressreizen birgt evolutionsbiologische Bezüge (Glover und Hill 2012). Laut dem „Mismatch-Modell“ trägt ein vorgeburtlicher Stressreiz zur Adaption des Fetus an eine stressreiche Umgebung im späteren Leben bei (Gluckman und Hanson 2004). So kann eine überschießende und prolongierte Stressreaktion weiblichen Säugern im späteren Leben in einer stressbehafteten Umgebung Überlebensvorteile sichern, da sie mit einer erhöhten Wachsamkeit in der Aufzucht der Jungtiere einherginge, wie an Primaten gezeigt werden konnte (Glover und Hill 2012, Vieau et al. 2007). Evolutionsbiologische Nachteile in Form einer erhöhten Anfälligkeit für verschiedene Erkrankungen erbringen diese Anpassungsvorgänge den Individuen aus Sicht

der Mismatch-Hypothese erst dann, wenn eine antizipierte stressreiche Umgebung im späteren Leben nicht eintritt (Gluckman et al. 2005b).

Mutterseparation

Die Auswirkungen einer MS auf die Entwicklung der HHN-Achse decken sich in unserem Experiment mit denen einer pränatalen GC-Therapie. Während im vorliegenden Versuch eine MS von je drei Stunden an den Tagen P4 bis P14 auf die Aktivität der HHN-Achse männlicher Tiere keinen relevanten Effekt hatte, boten die Weibchen im späteren Leben eine überschießende Stressantwort.

Der Einfluss der MS auf die Entwicklung der HHN-Achse in Abhängigkeit vom Geschlecht der untersuchten Spezies ist im Hinblick auf Ratten gut untersucht, die Studienlage jedoch nicht eindeutig (Weinstock 2007). Für Mäuse existieren hier nahezu keine Daten. Das in dieser Arbeit beschriebene Experiment liefert eine wichtige Ergänzung zum aktuellen Kenntnisstand. In einer Studie führte MS (täglich 4,5 h in den Tagen P1 bis P21) im Rattenmodell beispielsweise bei zwei Monate alten Männchen, nicht jedoch bei Weibchen, zu einer verminderten Reaktion der HHN-Achse auf akuten Stress (Renard et al. 2007). Ein anderer Versuch zeigte bei Ratten im Alter von fünf Monaten einen gegenläufigen Effekt, nämlich eine in Folge von MS (täglich 3 h an den Tagen P3 bis P10) gesteigerte Stressantwort männlicher, nicht jedoch weiblicher Ratten auf einen milden emotionalen Stressreiz (Wigger und Neumann 1999). Dies legt auch für den Einfluss einer MS auf die Entwicklung der HHN-Achse eine altersabhängige Wirkung nahe; während zwölf Monate alte Tiere nach MS (24 h an P3) in einer weiteren Studie am Rattenmodell eine überschießende Stressantwort aufwiesen, zeigten drei und dreißig Monate alte Tiere eine verminderte Antwort der HHN-Achse auf kurzzeitigen Immobilitätsstress (Workel et al. 2001). Die Daten des vorliegenden Versuchs zeigen im Hinblick auf die Aktivität der Stressachse im Mausmodell anders als bei Ratten eine stärkere Beeinflussung der Weibchen durch die MS, was sich auch mit den bereits erläuterten Ergebnissen in Bezug auf die pränatale GC-Therapie deckt.

Ein möglicher Mechanismus, über den eine MS zu einer Fehlregulation der Stressachse im späteren Leben führt, könnte die bereits während der MS einsetzende und bis ins Erwachsenenalter anhaltende Herunterregulierung von GR und dem damit gestörten Feedback-Mechanismus der HHN-Achse sein (de Kloet et al. 2005a, Vazquez et al. 1996, Ladd et al. 2004). Bei acht Wochen alten Ratten fanden sich in Folge einer MS (täglich 4 h an den

Tagen P2 bis P13) neben einer verstärkten CORT-Antwort auf akuten Immobilitätsstress, epigenetische Veränderungen wie eine vermehrte Hypermethylierung des CRH-Promoters CRE (cAMP-response element) und damit eine verstärkte Transkription des CRH-Gens in Reaktion auf die Stresssituation, was eine überschießende Aktivierung der HNN-Achse impliziert (Chen et al. 2012).

Der im Vergleich zur Kontrollgruppe trotz hyperresponsiver Stressachse verminderte CORT-Basalwert der Weibchen widerspricht Effekten einer MS in der Mehrzahl vorangegangener Studien, in denen der Basalwert bei erwachsenen Nagern durch MS entweder nicht beeinflusst [täglich 3 h von P3 bis P15, (Plotsky et al. 2005)] oder erhöht war [täglich 3 h von P2 bis P14 beziehungsweise täglich 6 h von P2 bis P15, (Ladd et al. 2004, Roque et al. 2014, van Bodegom et al. 2017)]. Lediglich ein Versuch zeigte analog zu den hier erhobenen Ergebnissen bei drei Monate alten Rattenweibchen einen verminderten Basalwert nach einer MS [täglich 3 h an den Tagen P3 bis P15, (Slotten et al. 2006)]. Da die weiblichen MS-Tiere in unserem Versuch dasselbe Protokoll durchliefen wie die übrigen Tiere, ist ein entscheidender Einfluss der Methodik, etwa durch eine effektiver eingehaltene Käfigruhe während der Versuche, welche den niedrigeren Basalwert prinzipiell erklären könnte, unwahrscheinlich. Warum die Tiere, wenngleich sie eine stärkere CORT-Ausschüttung nach akutem Stress hatten, im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderte Basalwerte aufwiesen, bleibt nach aktuellem Kenntnisstand noch ungeklärt.

6.2.2 Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf das Verhalten

Pränatale Glucocorticoid-Therapie

Mit Hilfe des Schwanzhalteversuches wurde der Einfluss von perinatalem Stress auf die Inaktivität in einer Situation ohne Fluchtmöglichkeit quantifiziert. Die Inaktivität kann dabei als Surrogatparameter für depressives Verhalten herangezogen werden (Cryan et al. 2005) Sowohl männliche als auch weibliche Mäuse mit pränataler GC-Behandlung wiesen in diesem Test im Vergleich zur Kontrollgruppe ein depressiveres Verhalten auf.

Die Einwirkung von pränatalen Stressreizen wird sowohl im Tierexperiment als auch in humanexperimentellen Studien mit einer höheren Prädisposition für psychiatrische Erkrankungen wie Depression, Schizophrenie und Angststörungen in Verbindung gebracht (Huang 2011, Weinstock 2008). Dies könnte unter anderem direkt auf erhöhte CORT-Spiegel,

welche wie in der Einleitung beschrieben Folge einer Programmierung der HHN-Achse sein können, zurückzuführen sein. So korrelierte bei unbehandelten Ratten im Forced Swimming Test, der ebenso wie der Schwanzhalteversuch Auskunft über depressives Verhalten gibt, eine langandauernde Inaktivität mit höheren CORT-Spiegeln während des Versuchs, wohingegen eine medikamentös herbeigeführt Reduktion der CORT-Konzentration durch Metopiron auch die Inaktivität reduzierte (Baez und Volosin 1994). Zudem konnten bei vier Monate alten, perinatal gestressten Ratten (Restrainer-Stress der Mutter in der letzten Gestationswoche), welche im Forced Swimming Test ein inaktiveres Verhalten gezeigt hatten als Kontrolltiere, eine verminderte Dichte an MR und GR im Hippocampus nachgewiesen werden und darüber hinaus auch eine höhere Konzentration an präfrontal gelegenen 5-HT_{1A}-Rezeptoren (Morley-Fletcher et al. 2004, Celada et al. 2013). Beide Veränderungen waren mittels einer längerfristigen antidepressiven Behandlung mit dem nichtselektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Imipramin reversibel, was auf die antidepressive Wirkung einer Aktivierung von 5-HT_{1A}-Rezeptoren durch das Medikament zurückzuführen sein könnte (Morley-Fletcher et al. 2004, Celada et al. 2013). Die hippocampalen Serotonin-Konzentrationen waren passend zu dieser Beobachtung bei zwei Monate alten Mäusen nach Immobilitätsstress der Mutter in der letzten Gestationswoche vermindert (Hayashi et al. 1998, Ishiwata et al. 2005). Dies zeigt, dass in Folge pränataler Stressreize nicht nur der GC-, sondern auch der Monoamin-Stoffwechsel gestört ist und sich beide Systeme wechselseitig beeinflussen. In den dorsalen Raphe-Kernen, wo die zentralen Serotonin-sezernierenden Neuronen lokalisiert sind, finden sich vermehrt GR-immunreaktive Zellen (Harfstrand et al. 1986, Morimoto et al. 1996). Sowohl Stressreize als auch exogene GC-Zufuhr sind in der Lage, den Serotoninsatz in Cortex und Mittelhirn zu steigern und die Serotoninausschüttung in den zentralen Amygdala-Kernen über eine Aktivierung des CRH-Rezeptors zu erhöhen (Singh et al. 1990, Mo et al. 2008, Lanfumey et al. 2008). Ein Erklärungsansatz für die Resultate der weiblichen Tiere ist demnach eine fehlregulierte HHN-Achse, die auch das monoaminerge Neurotransmittersystem beeinflusst. Im Rahmen des desensitivierten Feedback-Mechanismus der HHN-Achse zirkulieren mehr GC im Organismus, die unter anderem den Serotoninsatz erhöhen, wodurch weniger Moleküle des Neurotransmitters im synaptischen Spalt verfügbar sind – ein für die fetale Programmierung der unipolaren Depression denkbarer Pathomechanismus.

Der programmierende Effekt auf das Verhalten durch perinatalen Stress ist in dieser Arbeit bei männlichen Mäusen der Rasse C57/Bl6 stärker ausgeprägt als bei weiblichen. Derlei Geschlechtsunterschiede perinataler Programmierungsvorgänge des Verhaltens sind gut untersucht im NagermodeLL an verschiedenen Spezies wie Meerschweinchen, Ratten und Mäusen (Weinstock 2008). Bei adulten Mäusen ist eine höhere Prädisposition der männlichen Nachkommen für depressives Verhalten nach verschiedenartigen Stressreizen während der Schwangerschaft bekannt (Mueller und Bale 2008).

Da die männlichen Tiere im durchgeführten Experiment zwar ein depressiveres Verhalten zeigten, die HHN-Achse in Folge einer pränatalen GC-Therapie jedoch nicht beeinflusst war, spielen womöglich geschlechtsspezifisch weitere Mechanismen eine Rolle, über die pränataler Stress depressives Verhalten vermittelt. Bei Mäusen, deren Mütter in der letzten Schwangerschaftswoche mit DM behandelt worden waren, manifestierte sich beispielsweise depressives Verhalten erst im Alter von zwölf Monaten und zudem lediglich bei männlichen Tieren (Spulber et al. 2015). Zudem war bei den Ratten auch bereits zu früheren Zeitpunkten die zirkadiane Rhythmik der HHN-Achse und die Neurogenese im Hippocampus gestört (Spulber et al. 2015, Koehl et al. 1999). Beide Veränderungen lassen sich sowohl in Tiermodellen für die Depression als auch beim Menschen finden, wie anhand MR-Tomographie- und post-Mortem-Studien gezeigt werden konnte (Miller und Hen 2015). Unklar ist jedoch, ob die gestörte Neurogenese im Hippocampus ursächlich für die affektive Störung ist oder mit dieser in Tiermodellen der Depression lediglich korreliert und damit Ausdruck einer gestörten Funktion des Hippocampus im Rahmen der Erkrankung ist (Petric et al. 2012).

Neben dem Hippocampus ist die Amygdala eine weitere Hirnstruktur, deren Entwicklung offenbar durch pränatalen Stress beeinflusst wird und der eine Rolle in der Pathogenese von Angsterkrankungen und affektiven Störungen zugeschrieben wird (Weinstock 2008, Pezawas et al. 2005, Frodl et al. 2002). Nachkommen von Ratten, die in der letzten Gestationswoche mildem Stress in Form von täglichen Kochsalz-Injektionen ausgesetzt waren, zeigten im Alter von vier Monaten erhöhte Konzentrationen von CRH und dessen Rezeptor in der Amygdala sowie eine Volumenvermehrung der lateralen Amygdala (Cratty et al. 1995, Ward et al. 2000, Salm et al. 2004). Ein erhöhter CRH-Umsatz war im Mausmodell nach pränatalem Stress im Alter von vier Monaten mit einem vermehrt depressivem Verhalten assoziiert (Mueller und Bale 2008). Zudem fand sich bei den Tieren eine verminderte Expression GR und eine

verminderte Konzentration von Serotonin-Transportern im Hippocampus (Mueller und Bale 2008). Anders als im hier gezeigten Versuch waren diese Veränderungen jedoch auch mit einer hyperresponsiven Stressachse bei Männchen assoziiert. Dies spricht wiederum dafür, dass pränataler Stress nicht nur auf einem Weg Verhalten im späteren Leben programmiert, sondern dass sich die Effekte auf einzelne biologische Systeme wie HHN-Achse und psychoaktive Neurotransmitter wechselseitig beeinflussen.

Mutterseparation

In dem in dieser Arbeit dargestellten Versuch führte damit anders als bei pränataler GC-Gabe die MS bei den männlichen, nicht aber bei den weiblichen, Mäusen zu einem depressiveren Verhalten, das wie im Falle der pränatal mit sGC behandelten Männchen nicht mit einer Hyperaktivität der HHN-Achse vergesellschaftet war.

Vorangestellt sei, dass sich insbesondere in Bezug auf die Effekte der MS auf das Verhalten in der Literatur eine große Diskrepanz der Ergebnisse bietet, die laut einem aktuellen Review in erster Linie auf methodische Differenzen der Studien (siehe auch Kapitel 6.1.2) zurückgeführt werden sollte (Tractenberg et al. 2016). Dass die MS bei Mäusen im späteren Leben eine höhere Vulnerabilität für eine Depression nach sich zieht, erscheint jedoch eine belastbare Erkenntnis zu sein (Tractenberg et al. 2016)

CRH könnte, wie im vorangegangenen Abschnitt für die sGC-Gabe angedeutet, bei der Programmierung von affektiven Störungen auch in Folge der MS eine Rolle spielen. Eine MS von P2 bis P14 (täglich 3 h) führte bei vier Monate alten männlichen Ratten zu einer erhöhten CRH-Konzentration im Hippocampus (Plotsky und Meaney 1993). In einem ähnlichen Protokoll fand sich geschlechtsspezifisch bei vier Monate alten Männchen ebenfalls eine erhöhte CRH-Expression – jedoch nicht im Hippocampus, wo kein Unterschied bestand, sondern in der Amygdala (Barna et al. 2003). Wie bereits beschrieben, ist die Depression sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell häufig mit einer erhöhten CRH-Konzentration assoziiert. Zudem konnte bei zwei Monate alten männlichen Ratten im Alter von 3 Monaten, die im Forced Swimming Test ein vermehrt depressives Verhalten gezeigt hatten, eine verminderte Serotonin-Ausschüttung nachgewiesen werden (Bogdanova et al. 2013, Kirby et al. 1995). Während in einem weiteren Versuch zur MS (täglich 6 h von P5 bis P20) in einer Post-mortem-Untersuchung im Hippocampus beider Geschlechter verminderte Serotonin-Konzentrationen nachweisbar waren und diese Reduktion bei Männchen stärker war, fand sich eine solche

Hormonverminderung im präfrontalen Kortex lediglich von Männchen, was eine geschlechtsspezifische Beeinflussung dieses Hirnareals durch die MS vermuten lässt (Matthews et al. 2001). Zusammenfassend kommen hinsichtlich der Programmierung von depressivem Verhalten durch eine MS und durch eine pränatale GC-Therapie wahrscheinlich multiple einander überschneidende pathophysiologische Vorgänge zum Tragen, die die ähnliche Richtung und Intensität der Effekte erklären.

6.2.3 Der Einfluss einer perinatalen Glucocorticoid- oder Stressexposition auf das Schlaganfall-Outcome

Pränatale Glucocorticoid-Therapie

Unser Experiment zeigte nach einer pränatalen GC-Therapie bei Mäusen, die einen experimentell induzierten Schlaganfall erlitten, ein schlechteres funktionelles Outcome und größere Infarktareale in der MAP2-, nicht jedoch in der CV- und der GFAP-Färbung. Dies betraf beide Geschlechter gleichermaßen.

Der größere Verlust der MAP2-Immunreaktivität in Folge der MCAO könnte insbesondere auf eine Programmierung der Gefäßfunktion und des Gefäßtonus zurückzuführen sein. So unterliegen beispielsweise verschiedene vasokonstriktorische und -dilatatorische Agenzien wie ET-1, TX und NO in Folge pränataler Stressreize einer veränderten Expression, beziehungsweise ändert sich die Empfindlichkeit der Gefäße für diese Mediatoren, wie in Kapitel 2.6 bereits dargestellt wurde (Anwar et al. 2016). Eigene unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass im Rattenmodell eine pränatale DM-Behandlung an den Tagen E19 und E20 Veränderungen der zerebralen Vasoreagibilität bei den erwachsenen, 6-Monate alten Nachkommen bedingte. Die fetale Programmierung der Vasoreagibilität umfasste sowohl vasokonstriktorische als auch vasodilatative Signalwege mit geschlechtsspezifischen Unterschieden. Bei männlichen Ratten waren die endothelabhängige ET-1-vermittelte und die endothelunabhängige Vasokonstriktion auf Kalium verstärkt. Diese verstärkte Vasokonstriktionsleistung kann bei männlichen Tieren über die Verstärkung des zerebralen Vasotonus und Minderung der zerebralen Reservekapazität zu einer Vergrößerung des von der Ischämie betroffenen Hirnareals nach MCAO beitragen. Bei beiden Geschlechtern fand sich zudem eine vermehrte Prostaglandin-vermittelte Vasodilatationsleistung, welches als möglicher Kompensationsmechanismus interpretiert werden kann. Da die pränatale GC-Behandlung

aber zu einer Vergrößerung des Schlaganfallareals nach MCAO bei beiden Geschlechtern führte, scheint dieser kompensatorische Mechanismus hinsichtlich einer potenziellen Protektion nicht ausreichend zu sein.

Auch kann sowohl mütterlicher psychologischer Stress als auch die pränatale Gabe von sGC einen erhöhten Sympathikotonus im späteren Leben zur Folge haben (Alexander et al. 2015, Young 2002). Als Antwort auf akuten Stress in Form eines Schmerzreizes fanden sich beispielsweise bei fünf Monate alten Ratten, welche während der gesamten Schwangerschaft wiederholt unvorhergesehenen physikalischen Stressreizen ausgesetzt waren, höhere Konzentrationen von Katecholaminen in Antwort auf einen elektrischen Fußschock, was für einen verstärkte Aktivität des sympathischen Nervensystems spricht (Weinstock et al. 1998). Auch ohne vorangegangenen akuten Stressreiz war der Adrenalinumsatz im zentralen Nervensystem bei zwei Monate alten Ratten in Folge psychologischen Stresses während der Gestation erhöht (Takahashi et al. 1992). Ein gesteigerter Sympathikotonus wiederum konnte als Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse identifiziert werden (Parati und Esler 2012, Curtis und O'Keefe 2002). Dies könnte im Falle einer zerebralen Ischämie darin begründet sein, dass insbesondere zentrale Gefäße durch Fasern des sympathischen Nervensystems innerviert werden und eine Gefäßengstellung bewirken (Hamel 2006, van Lieshout und Secher 2008, Paulson et al. 1990). Im Falle einer vermehrten Aktivierung des Sympathikus werden zerebrale Gefäße in ihrer Autoregulation in Richtung einer Gefäßengstellung beziehungsweise einer ungenügenden maximalen Vasodilatation gestört, was im Rahmen eines Schlaganfalls die Perfusion des Hirngewebes und somit das spätere Outcome verschlechtern kann (van Lieshout und Secher 2008)

Auch die Entzündungsreaktion im späteren Leben kann durch pränatalen Stress nachhaltig beeinflusst werden, was zerebrale Strukturen vulnerabler für hypoxische Zustände macht. So konnten bei fünf Monate alten, ovariectomierten Nachkommen von pränatal gestressten Mäusen (Immobilitätsstress während der Gestation) höhere hippocampale Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β nachgewiesen werden (Diz-Chaves et al. 2012). Dies kann wiederum über eine Stimulation der Ausschüttung von CRH zu einer Aktivierung der HNN-Achse beitragen (Barbazanges et al. 1996, Diz-Chaves et al. 2012, Sapolsky et al. 1987). Während IL-1 β überwiegend durch ortsständige Monozyten und Makrophagen des Gehirns ausgeschüttet wird, sind T-Lymphozyten eine weitere Zellpopulation, die für die sekundäre Entzündungsreaktion nach einem Schlaganfall eine Rolle spielen (Tobin et al. 2014). Sie

wandern im Falle einer zerebralen Ischämie über die durch den Zellschaden geschädigte Bluthirnschranke ein, sezernieren weitere proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) und halten auf diese Weise die Entzündungsreaktion in Gang (Tobin et al. 2014). Eine die T-Lymphozyten adressierende experimentelle Intervention kann demzufolge wahrscheinlich über eine veränderte Entzündungsreaktion das Schlaganfall-Outcome beeinflussen, denn Knock-out-Mäuse der Rasse C57/Bl6 mit ausgeschaltetem CD8(Cluster of Differentiation)-Rezeptor auf T-Lymphozyten sowie IFN- γ -defiziente Versuchstiere wiesen nach MCAO signifikant kleinere Infarkte auf (Yilmaz et al. 2006). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass eine pränatale GC-Therapie sowohl vermittelt durch GC als auch über das noradrenerge System zu einer Verminderung der CD4⁺/CD8⁺-Ratio im späteren Leben führen kann (Viltart und Vanbesien-Mailliot 2007). Ist der Anteil an CD8-positiven Lymphozyten also durch perinatal erhöhte GC-Spiegel vermehrt, hat dies im adulten Organismus unter anderem die verstärkte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und damit eine stärkere lokale inflammatorische Antwort zur Folge. Auch kann eine intensivere Entzündungsreaktion durch eine inadäquate sympathische Aktivierung induziert werden, da noradrenerge Fasern den Thymus innervieren (Elenkov et al. 2000). Zwar ist eine verstärkte postischämische Entzündungsreaktion des Gehirns eine mögliche Ursache für die Verschlechterung des Schlaganfall-Outcomes. In der GFAP-Färbung fand sich bei den mit DM vorbehandelten Tieren aber kein entsprechendes Korrelat in Form eines größeren Astrogliose-Areals. Um diesen möglichen Pathomechanismus in künftigen Experimenten näher nachvollziehen zu können, könnte beispielsweise die Bestimmung der Konzentration von Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IL-1 β oder IFN- γ aus dem Infarktareal erfolgen.

Mutterseparation

Im vorliegenden Versuchsaufbau hatte die MS an den Tagen P4 bis P14 im Unterschied zur pränatalen GC-Therapie weder bei weiblichen noch bei männlichen Tieren einen Effekt auf die Infarktgröße und das funktionelle Outcome nach MCAO.

Die Studienlage im Hinblick auf die fetale Programmierung des Outcomes nach fokalen Ischämien in Folge postnataler Stressreize wie der MS ist spärlich. Ein Experiment untersuchte, wie sich eine MS (täglich 3 h von P1 bis P6) auf eine durch permanente Okklusion der ACI induzierte Ischämie auswirkte, und fand bei sieben Tage alten Weibchen und Männchen keinen relevanten Unterschied in der Infarktgröße (Tata et al. 2015). Auch bei drei Monate alten Ratten (MS täglich 8 h von P3 bis P7) fanden sich keine Unterschiede in der Infarktgröße

(Hays et al. 2013). Darüber hinaus war auch die Angiogenese im Gehirn nicht verändert (Hays et al. 2013). Im Falle einer weiteren Studie hatte eine MS (täglich 15 min von P1 bis P15) bei männlichen Mäusen eine hyporesponsive HHN-Achse zur Folge, die mit größeren Infarkten in Folge einer MCAO im Alter von vier Monaten vergesellschaftet war (Craft et al. 2006). Die höhere Vulnerabilität für Schlaganfälle dieser stresshyporesponsiven Spezies wurde unter anderem damit erklärt, dass durch die in Antwort auf die zerebrale Ischämie im Vergleich zu Kontrolltieren verminderte CORT-Ausschüttung eine schwächere Immunsuppression erfolgt und damit eine schwerwiegendere sekundäre Entzündungsreaktion des ZNS mit erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-1 β sowie einem größeren Ödem einhergeht (Craft et al. 2006, Stoll et al. 2002). Neben der veränderten Immunantwort weist das ZNS im Falle einer hyporesponsiven Stressachse auch eine größere Empfindlichkeit gegenüber GC-vermittelter neuronaler Toxizität auf, da GR im Falle einer gedämpften HHN-Achse hochreguliert sind (Craft et al. 2006, Babenko et al. 2015). In dieser Arbeit wurde der postnatale Stressreiz jeweils für nur 15 min am Tag angewendet, was eine Vergleichbarkeit mit den anderen zitierten Studien sowie dem vorliegenden Versuch einschränkt, die jeweils mehrstündige Vereinzelung der Jungtiere von der Mutter vorsahen (Craft et al. 2006, Hays et al. 2013, Tata et al. 2015). Wie in Kapitel 6.1.2 beschrieben, führt eine kurze MS potenziell eher zur Entwicklung einer hyporesponsiven HHN-Achse, eine länger andauernde MS kann hingegen eine hyperresponsive Stressachse zu Folge haben. Zwar wiesen die MS-Weibchen im hier dargestellten Experiment eine überschießende Stressantwort auf. Einen Effekt auf die Vulnerabilität für zerebrale Ischämien zeigte sich jedoch anders als bei den weiblichen Tieren der Gruppe GC (E16/17), die ebenfalls eine hyperresponsive HHN-Achse hatten, nicht. Dies spricht dafür, dass - wie bereits diskutiert - eine fehlregulierte Stressantwort nicht der einzige Mechanismus zu sein scheint, über den perinataler Stress zu einer Programmierung der Anfälligkeit für zerebrale Ischämien im späteren Leben führt. Weitere Wege, über welche möglicherweise die Programmierung eines schlechteren Schlaganfall-Outcomes durch einen postnatalen Stressreiz erfolgt, könnten den vorangegangenen Ausführungen zu Folge ähnlich wie bei einer pränatalen sGC-Gabe die Modulation von Gefäßtonus und -Funktion sowie der Entzündungsreaktion im adulten Gehirn sein.

7 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Diese Arbeit konnte zeigen, dass eine pränatale Behandlung mit DM, wie sie in der klinischen Praxis zur Lungenreifung bei drohender Frühgeburt angewandt wird, bei adulten Mäusen die Größe von Schlaganfällen und das funktionelle Outcome nach zerebraler Ischämie negativ beeinflussen kann. Bei den weiblichen Tieren konnte darüber hinaus eine hyperaktive HHN-Achse nachgewiesen werden. Die überschießende Stressachse ist dabei eine mögliche Erklärung für das schlechtere Schlaganfall-Outcome der Weibchen. So kann die gestörte negative Rückkopplung der Stressachse als Folge einer Desensitivierung der zerebralen GR zu einer zeitlebens vermehrten CORT-Exposition führen (Schwab 2009). Dies könnte unter anderem eine verminderte Suppression der sekundären Entzündungsreaktion nach Schlaganfall zur Folge haben und auf diesem Weg den sekundären apoptotischen Zelluntergang verstärken (Diz-Chaves et al. 2012, Wang et al. 2007). Eine hyperaktive HHN-Achse bei den weiblichen Tieren war im vorliegenden Versuch zudem mit depressivem Verhalten assoziiert. Für diese Beobachtung, die sich auch in epidemiologischen Studien zeigte, ist möglicherweise eine verminderte Bioverfügbarkeit des Neurotransmitters Serotonin in Folge der höheren CORT-Spiegel ursächlich (Holsboer 2001).

Unbeantwortet bleibt letztlich die Frage, warum dieselbe pränatale Intervention bei Weibchen, nicht jedoch bei Männchen, einen programmierenden Effekt auf die HHN-Achse hatte, sich aber bei beiden Geschlechtern ein schlechteres Schlaganfall-Outcome zeigte. Demnach könnten weitere Mechanismen für das schlechtere Schlaganfalloutcome verantwortlich sein, wie zum Beispiel die pränatale Programmierung eines erhöhten Gefäßtonus, der zu einer verstärkten Vasokonstriktion nach Schlaganfall und dadurch zur Vergrößerung des Infarktes führen kann (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Zur genaueren Charakterisierung des Phänotyps der pränatal programmierten Tiere ist in künftigen Versuchen darüber hinaus eine Erhebung von inflammatorisch wirksamen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β oder IFN- γ (möglichst auch aus dem Infarktgewebe) wünschenswert. So könnte festgestellt werden, ob sowohl eine nicht veränderte Stressantwort bei den Männchen als auch eine überschießende Antwort der HHN-Achse im Falle der Weibchen mit einer veränderten Ausschüttung dieser Entzündungsmediatoren einhergeht. Mit der zusätzlichen Bestimmung von CRH und ACTH wäre eine Lokalisation der funktionellen Störung innerhalb der HHN-Achse möglich. Auch bietet sich im Mausmodell die gentechnische Veränderung von Rezeptoren der Entzündungskaskade an, um den Einfluss verschiedener Komponenten zu

untersuchen, die Einfluss auf die Stressantwort haben. Welche Faktoren zu einem geschlechtsabhängigen Effekt von perinatalem Stressreizen führen, sollte ebenfalls Gegenstand künftiger wissenschaftlicher Arbeiten sein.

Die Versuche zur Depression betreffend, stellt sich die Frage, ob eine antidepressive Behandlung der Mäuse den eine Depression programmierenden Effekt in Abhängigkeit des pränatalen Stressreizes abzumildern vermag. Hierbei wäre interessant, welche durch verschiedene Medikamente zu adressierenden Neurotransmittersysteme für diesen reversiblen Effekt verantwortlich sein könnten.

Eine weitere Variable, die vermutlich sowohl die Pathogenese von Schlaganfällen als auch die der affektiven Störungen beeinflusst, ist die Neurogenese im adulten Gehirn (Chen et al. 2013). Diese war nicht Gegenstand des vorliegenden Experiments, unterliegt jedoch ebenso wie die untersuchte HHN-Achse vermutlich einer Programmierung durch pränatalen Stress (Lemaire et al. 2000). Insbesondere Wachstumsfaktoren wie BDNF (brain derived neurotrophic factor) könnten eine wichtige Rolle bei Reparaturvorgängen nach zerebralen Ischämien spielen, sodass eine Programmierung der Neurogenese durch pränatalen Stress als Pathomechanismus denkbar ist (Boersma et al. 2014, Chen et al. 2013, Lasek-Bal et al. 2015).

Noch nicht eindeutig charakterisiert sind die Zeitpunkte in der Schwangerschaft, während derer einzelne Organsysteme, zum Beispiel die HHN-Achse, vulnerabel für eine pränatale Programmierung durch die Gabe synthetischer GC sind. Perspektivisch könnte eine genauere Eingrenzung stressvulnerabler Zeitpunkte beim Menschen den selektiven Einsatz einer pränatalen GC-Therapie zu Schwangerschaftszeitpunkten ermöglichen, in denen langfristige negative Effekte auf die spätere Funktion bestimmter Organe weniger wahrscheinlich sind.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit an einem kliniknahen Mausmodell Folgen einer kurz andauernden pränatalen GC-Gabe für die Gesundheit im späteren Leben aufgezeigt werden. Die Bedeutung dieser Behandlung in der Perinatalmedizin ist zwar unbestritten, doch sollte vor dem Hintergrund des aktuellen Wissensstandes auf dem Forschungsfeld der fetalen Programmierung der Einsatz der Therapie erst nach sorgfältiger Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen, solange nicht weitere experimentelle und epidemiologische Daten zu den Langzeitfolgen im späteren Leben vorliegen.

8 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Abe H, Hidaka N, Kawagoe C, Odagiri K, Watanabe Y, Ikeda T, Ishizuka Y, Hashiguchi H, Takeda R, Nishimori T, Ishida Y. 2007. Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neurosci Res*, 59 (2):145-151.
- Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, 3rd. 1993. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*, 24 (1):35-41.
- Aguilera G. 2011. HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging. *Exp Gerontol*, 46 (2-3):90-95.
- Aickin M, Gensler H. 1996. Adjusting for multiple testing when reporting research results: the Bonferroni vs Holm methods. *Am J Public Health*, 86 (5):726-728.
- Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ. 2008. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience*, 154 (4):1218-1226.
- Alexander BT, Dasinger JH, Intapad S. 2015. Fetal programming and cardiovascular pathology. *Compr Physiol*, 5 (2):997-1025.
- Alvarez-Buylla A, Ling CY, Kirn JR. 1990. Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain. *J Neurosci Methods*, 33 (2-3):129-133.
- American College of O, Gynecologists Committee on Obstetric P. 2008. ACOG Committee Opinion No. 402: Antenatal corticosteroid therapy for fetal maturation. *Obstet Gynecol*, 111 (3):805-807.
- Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM. 2011a. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*, 36 (3):415-425.
- Anacker C, Zunszain PA, Cattaneo A, Carvalho LA, Garabedian MJ, Thuret S, Price J, Pariante CM. 2011b. Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. *Mol Psychiatry*, 16 (7):738-750.
- Andersen SL. 2003. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev*, 27 (1-2):3-18.
- Anisman H, Ravindran AV, Griffiths J, Merali Z. 1999. Interleukin-1 beta production in dysthymia before and after pharmacotherapy. *Biol Psychiatry*, 46 (12):1649-1655.
- Anwar MA, Saleh AI, Al Olabi R, Al Shehabi TS, Eid AH. 2016. Glucocorticoid-induced fetal origins of adult hypertension: Association with epigenetic events. *Vascul Pharmacol*, 82:41-50.
- AQUA Bundesauswertung zum Verfahrensjahr 2015 16/1 – Geburtshilfe
- Armario A, Castellanos JM. 1984. A comparison of corticoadrenal and gonadal responses to acute immobilization stress in rats and mice. *Physiol Behav*, 32 (4):517-519.
- Aronowski J, Samways E, Strong R, Rhoades HM, Grotta JC. 1996. An alternative method for the quantitation of neuronal damage after experimental middle cerebral artery occlusion in rats: analysis of behavioral deficit. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16 (4):705-713.
- Babenko O, Kovalchuk I, Metz GA. 2015. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. *Neurosci Biobehav Rev*, 48:70-91.
- Baez M, Volosin M. 1994. Corticosterone influences forced swim-induced immobility. *Pharmacol Biochem Behav*, 49 (3):729-736.
- Bailoo JD, Jordan RL, Garza XJ, Tyler AN. 2014. Brief and long periods of maternal separation affect maternal behavior and offspring behavioral development in C57BL/6 mice. *Dev Psychobiol*, 56 (4):674-685.
- Bakker JM, Schmidt ED, Kroes H, Kavelaars A, Heijnen CJ, Tilders FJ, van Rees EP. 1995. Effects of short-term dexamethasone treatment during pregnancy on the development of the immune system and the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the rat. *J Neuroimmunol*, 63 (2):183-191.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*, 16 (1):1-13.
- Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Maccari S. 1996. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci*, 16 (12):3943-3949.

- Barker DJ. 1998. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*, 95 (2):115-128.
- Barna I, Balint E, Baranyi J, Bakos N, Makara GB, Haller J. 2003. Gender-specific effect of maternal deprivation on anxiety and corticotropin-releasing hormone mRNA expression in rats. *Brain Res Bull*, 62 (2):85-91.
- Bartus RT, Dean RL, Cavanaugh K, Eveleth D, Carriero DL, Lynch G. 1995. Time-related neuronal changes following middle cerebral artery occlusion: implications for therapeutic intervention and the role of calpain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15 (6):969-979.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. 1986. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17 (3):472-476.
- Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. 1992. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma*, 9 (3):197-217.
- Beitins IZ, Bayard F, Ances IG, Kowarski A, Migeon CJ. 1973. The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatr Res*, 7 (5):509-519.
- Belayev L, Busto R, Zhao W, Fernandez G, Ginsberg MD. 1999. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res*, 833 (2):181-190.
- Belnoue L, Grosjean N, Ladeveze E, Abrous DN, Koehl M. 2013. Prenatal stress inhibits hippocampal neurogenesis but spares olfactory bulb neurogenesis. *PLoS One*, 8 (8):e72972.
- Bertram C, Trowern AR, Copin N, Jackson AA, Whorwood CB. 2001. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology*, 142 (7):2841-2853.
- Biagini G, Pich EM, Carani C, Marrama P, Agnati LF. 1998. Postnatal maternal separation during the stress hypo-responsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Int J Dev Neurosci*, 16 (3-4):187-197.
- Boersma GJ, Lee RS, Cordner ZA, Ewald ER, Purcell RH, Moghadam AA, Tamashiro KL. 2014. Prenatal stress decreases Bdnf expression and increases methylation of Bdnf exon IV in rats. *Epigenetics*, 9 (3):437-447.
- Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. 2013. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav*, 118:227-239.
- Braeuninger S, Kleinschnitz C. 2009. Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Exp Transl Stroke Med*, 1:8.
- Bresnahan JC, Beattie MS, Todd FD, 3rd, Noyes DH. 1987. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp Neurol*, 95 (3):548-570.
- Brown AS, van Os J, Driessens C, Hoek HW, Susser ES. 2000. Further evidence of relation between prenatal famine and major affective disorder. *Am J Psychiatry*, 157 (2):190-195.
- Brown RW, Chapman KE, Kotelevtsev Y, Yau JL, Lindsay RS, Brett L, Leckie C, Murad P, Lyons V, Mullins JJ, Edwards CR, Seckl JR. 1996. Cloning and production of antisera to human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Biochem J*, 313 (Pt 3):1007-1017.
- Buckley TM, Schatzberg AF. 2005. On the interactions of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sleep: normal HPA axis activity and circadian rhythm, exemplary sleep disorders. *J Clin Endocrinol Metab*, 90 (5):3106-3114.
- Buynitsky T, Mostofsky DI. 2009. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*, 33 (7):1089-1098.
- Carmichael ST. 2005. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*, 2 (3):396-409.
- Carroll BJ, Curtis GC, Mendels J. 1976a. Cerebrospinal fluid and plasma free cortisol concentrations in depression. *Psychol Med*, 6 (2):235-244.

- Carroll BJ, Curtis GC, Davies BM, Mendels J, Sugerman AA. 1976b. Urinary free cortisol excretion in depression. *Psychol Med*, 6 (1):43-50.
- Carroll BJ, Schroeder K, Mukhopadhyay S, Greden JF, Feinberg M, Ritchie J, Tarika J. 1980. Plasma dexamethasone concentrations and cortisol suppression response in patients with endogenous depression. *J Clin Endocrinol Metab*, 51 (3):433-437.
- Carswell HV, Dominiczak AF, Macrae IM. 2000a. Estrogen status affects sensitivity to focal cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278 (1):H290-294.
- Carswell HV, Anderson NH, Morton JJ, McCulloch J, Dominiczak AF, Macrae IM. 2000b. Investigation of estrogen status and increased stroke sensitivity on cerebral blood flow after a focal ischemic insult. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20 (6):931-936.
- Celada P, Bortolozzi A, Artigas F. 2013. Serotonin 5-HT_{1A} receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research. *CNS Drugs*, 27 (9):703-716.
- Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M. 2013. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Rep*, 1 (2):167-176.
- Chen J, Evans AN, Liu Y, Honda M, Saavedra JM, Aguilera G. 2012. Maternal deprivation in rats is associated with corticotrophin-releasing hormone (CRH) promoter hypomethylation and enhances CRH transcriptional responses to stress in adulthood. *J Neuroendocrinol*, 24 (7):1055-1064.
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*, 105 (1):7-17.
- Clark WM, Lessov NS, Dixon MP, Eckenstein F. 1997. Monofilament intraluminal middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Neurol Res*, 19 (6):641-648.
- Cole TJ, Blendy JA, Schmid W, Strahle U, Schutz G. 1993. Expression of the mouse glucocorticoid receptor and its role during development. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 47 (1-6):49-53.
- Cottrell EC, Seckl JR. 2009. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front Behav Neurosci*, 3:19.
- Craft TK, Devries AC. 2009. Vulnerability to stroke: implications of perinatal programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Front Behav Neurosci*, 3:54.
- Craft TK, Zhang N, Glasper ER, Hurn PD, Devries AC. 2006. Neonatal factors influence adult stroke outcome. *Psychoneuroendocrinology*, 31 (5):601-613.
- Cratty MS, Ward HE, Johnson EA, Azzaro AJ, Birkle DL. 1995. Prenatal stress increases corticotropin-releasing factor (CRF) content and release in rat amygdala minces. *Brain Res*, 675 (1-2):297-302.
- Crowley PA. 1995. Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. *Am J Obstet Gynecol*, 173 (1):322-335.
- Crudo A, Petropoulos S, Suderman M, Moisiadis VG, Kostaki A, Hallett M, Szyf M, Matthews SG. 2013a. Effects of antenatal synthetic glucocorticoid on glucocorticoid receptor binding, DNA methylation, and genome-wide mRNA levels in the fetal male hippocampus. *Endocrinology*, 154 (11):4170-4181.
- Crudo A, Suderman M, Moisiadis VG, Petropoulos S, Kostaki A, Hallett M, Szyf M, Matthews SG. 2013b. Glucocorticoid programming of the fetal male hippocampal epigenome. *Endocrinology*, 154 (3):1168-1180.
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. 2005. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, 29 (4-5):571-625.
- Curtis BM, O'Keefe JH, Jr. 2002. Autonomic tone as a cardiovascular risk factor: the dangers of chronic fight or flight. *Mayo Clin Proc*, 77 (1):45-54.
- Czock D, Keller F, Rasche FM, Haussler U. 2005. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet*, 44 (1):61-98.
- Dallman MF, Akana SF, Scribner KA, Bradbury MJ, Walker CD, Strack AM, Cascio CS. 1992. Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol*, 4 (5):517-526.

- Dalvi A, Lucki I. 1999. Murine models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, 147 (1):14-16.
- Dalziel SR, Walker NK, Parag V, Mantell C, Rea HH, Rodgers A, Harding JE. 2005. Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial. *The Lancet*, 365 (9474):1856-1862.
- Darnaudey M, Maccari S. 2008. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Res Rev*, 57 (2):571-585.
- Dawson DA, Hallenbeck JM. 1996. Acute focal ischemia-induced alterations in MAP2 immunostaining: description of temporal changes and utilization as a marker for volumetric assessment of acute brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16 (1):170-174.
- De Camilli P, Miller PE, Navone F, Theurkauf WE, Vallee RB. 1984. Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience*, 11 (4):817-846.
- de Castro AG, Bajbouj M, Schlattmann P, Lemke H, Heuser I, Neu P. 2008. Cerebrovascular reactivity in depressed patients without vascular risk factors. *J Psychiatr Res*, 42 (1):78-82.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. 2005a. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 6 (6):463-475.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*, 19 (3):269-301.
- de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt MV. 2005b. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev*, 29 (2):271-281.
- de Kloet ER, Ratka A, Reul JM, Sutanto W, Van Eekelen JA. 1987. Corticosteroid receptor types in brain: regulation and putative function. *Ann N Y Acad Sci*, 512:351-361.
- DGGG. 2008. Antenatale Kortikosteroide zur Lungenreifung.
- Dietrich WD, Ginsberg MD, Busto R, Watson BD. 1986. Photochemically induced cortical infarction in the rat. 2. Acute and subacute alterations in local glucose utilization. *J Cereb Blood Flow Metab*, 6 (2):195-202.
- Dirnagl U. 2006. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26 (12):1465-1478.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22 (9):391-397.
- Diz-Chaves Y, Pernia O, Carrero P, Garcia-Segura LM. 2012. Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *J Neuroinflammation*, 9:71.
- Dobbing J, Sands J. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 3 (1):79-83.
- Dodic M, May CN, Wintour EM, Coghlan JP. 1998. An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. *Clin Sci (Lond)*, 94 (2):149-155.
- Dodic M, Peers A, Moritz K, Hantzis V, Wintour EM. 2002a. No evidence for HPA reset in adult sheep with high blood pressure due to short prenatal exposure to dexamethasone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282 (2):R343-350.
- Dodic M, Abouantoun T, O'Connor A, Wintour EM, Moritz KM. 2002b. Programming effects of short prenatal exposure to dexamethasone in sheep. *Hypertension*, 40 (5):729-734.
- Dogru MT, Simsek V, Sahin O, Ozer N. 2010. Differences in autonomic activity in individuals with optimal, normal, and high-normal blood pressure levels. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 38 (3):182-188.
- Dong JY, Zhang YH, Tong J, Qin LQ. 2012. Depression and risk of stroke: a meta-analysis of prospective studies. *Stroke*, 43 (1):32-37.
- Dormer RA, France JT. 1973. Cortisol and cortisone levels in umbilical cord plasma and maternal plasma of normal pregnancies. *Steroids*, 21 (4):497-510.
- Doyle LW, Ford GW, Davis NM, Callanan C. 2000. Antenatal corticosteroid therapy and blood pressure at 14 years of age in preterm children. *Clin Sci (Lond)*, 98 (2):137-142.
- Dutta S, Sengupta P. 2016. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci*, 152:244-248.

- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. 2000. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*, 52 (4):595-638.
- Eng LF. 1985. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol*, 8 (4-6):203-214.
- Eng LF, DeArmond SJ. 1981. Glial fibrillary acidic (GFA) protein immunocytochemistry in development and neuropathology. *Prog Clin Biol Res*, 59A:65-79.
- Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V. 2011. Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp*, (47).
- Entringer S, Kumsta R, Hellhammer DH, Wadhwa PD, Wust S. 2009. Prenatal exposure to maternal psychosocial stress and HPA axis regulation in young adults. *Horm Behav*, 55 (2):292-298.
- Fernandez Macedo GV, Cladouchos ML, Sifonios L, Cassanelli PM, Wikinski S. 2013. Effects of fluoxetine on CRF and CRF1 expression in rats exposed to the learned helplessness paradigm. *Psychopharmacology (Berl)*, 225 (3):647-659.
- Festing MF, Fisher EM. 2000. Mighty mice. *Nature*, 404 (6780):815.
- Fowden AL, Valenzuela OA, Vaughan OR, Jellyman JK, Forhead AJ. 2016. Glucocorticoid programming of intrauterine development. *Domest Anim Endocrinol*, 56 Suppl:S121-132.
- Frodl T, Meisenzahl E, Zetzsche T, Bottlender R, Born C, Groll C, Jager M, Leinsinger G, Hahn K, Moller HJ. 2002. Enlargement of the amygdala in patients with a first episode of major depression. *Biol Psychiatry*, 51 (9):708-714.
- Gilland E, Bona E, Hagberg H. 1998. Temporal changes of regional glucose use, blood flow, and microtubule-associated protein 2 immunostaining after hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18 (2):222-228.
- Gitau R, Fisk NM, Glover V. 2001. Maternal stress in pregnancy and its effect on the human foetus: an overview of research findings. *Stress*, 4 (3):195-203.
- Glavin GB, Pare WP, Sandbak T, Bakke HK, Murison R. 1994. Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev*, 18 (2):223-249.
- Glover V. 2011. Annual Research Review: Prenatal stress and the origins of psychopathology: an evolutionary perspective. *J Child Psychol Psychiatry*, 52 (4):356-367.
- Glover V, Hill J. 2012. Sex differences in the programming effects of prenatal stress on psychopathology and stress responses: an evolutionary perspective. *Physiol Behav*, 106 (5):736-740.
- Gluckman PD, Hanson MA. 2004. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*, 305 (5691):1733-1736.
- Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG. 2005a. Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends Ecol Evol*, 20 (10):527-533.
- Gluckman PD, Hanson MA, Morton SM, Pinal CS. 2005b. Life-long echoes--a critical analysis of the developmental origins of adult disease model. *Biol Neonate*, 87 (2):127-139.
- Gobinath AR, Mahmoud R, Galea LA. 2014. Influence of sex and stress exposure across the lifespan on endophenotypes of depression: focus on behavior, glucocorticoids, and hippocampus. *Front Neurosci*, 8:420.
- Guijarro JZ, Tiba PA, Ferreira TL, Kawakami SE, Oliveira MG, Suchecki D. 2007. Effects of brief and long maternal separations on the HPA axis activity and the performance of rats on context and tone fear conditioning. *Behav Brain Res*, 184 (2):101-108.
- Hagemann G, Redecker C, Neumann-Haefelin T, Freund HJ, Witte OW. 1998. Increased long-term potentiation in the surround of experimentally induced focal cortical infarction. *Ann Neurol*, 44 (2):255-258.
- Hamel E. 2006. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* (1985), 100 (3):1059-1064.
- Harfstrand A, Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Zini I, Wikstrom AC, Okret S, Yu ZY, Goldstein M, Steinbusch H, et al. 1986. Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (24):9779-9783.
- Harris A, Seckl J. 2011. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav*, 59 (3):279-289.

- Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N. 1998. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int J Dev Neurosci*, 16 (3-4):209-216.
- Hays SL, Valieva OA, McPherson RJ, Juul SE, Gleason CA. 2013. Adult responses to an ischemic stroke in a rat model of neonatal stress and morphine treatment. *Int J Dev Neurosci*, 31 (1):25-29.
- Henry C, Kabbaj M, Simon H, Le Moal M, Maccari S. 1994. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J Neuroendocrinol*, 6 (3):341-345.
- Hernandez TD, Schallert T. 1988. Seizures and recovery from experimental brain damage. *Exp Neurol*, 102 (3):318-324.
- Herrera DG, Cuello AC. 1992. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity following cortical devascularizing lesion. *Neuroscience*, 49 (4):781-791.
- Holsboer F. 2001. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord*, 62 (1-2):77-91.
- Holsboer F, Ising M. 2008. Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*, 583 (2-3):350-357.
- Hossmann KA. 2006. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol*, 26 (7-8):1057-1083.
- Huang LT. 2011. The link between perinatal glucocorticoids exposure and psychiatric disorders. *Pediatr Res*, 69 (5 Pt 2):19R-25R.
- Igosheva N, Taylor PD, Poston L, Glover V. 2007. Prenatal stress in the rat results in increased blood pressure responsiveness to stress and enhanced arterial reactivity to neuropeptide Y in adulthood. *J Physiol*, 582 (Pt 2):665-674.
- Ishiwata H, Shiga T, Okado N. 2005. Selective serotonin reuptake inhibitor treatment of early postnatal mice reverses their prenatal stress-induced brain dysfunction. *Neuroscience*, 133 (4):893-901.
- Joels M, Pu Z, Wiegert O, Oitzl MS, Krugers HJ. 2006. Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn Sci*, 10 (4):152-158.
- Kanemitsu H, Nakagomi T, Tamura A, Tsuchiya T, Kono G, Sano K. 2002. Differences in the extent of primary ischemic damage between middle cerebral artery coagulation and intraluminal occlusion models. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22 (10):1196-1204.
- Kapoor A, Petropoulos S, Matthews SG. 2008. Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. *Brain Res Rev*, 57 (2):586-595.
- Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. 2006. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol*, 572 (Pt 1):31-44.
- Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, Li Y, Raisman G. 2012. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res*, 349 (1):169-180.
- Kertes DA, Kamin HS, Hughes DA, Rodney NC, Bhatt S, Mulligan CJ. 2016. Prenatal Maternal Stress Predicts Methylation of Genes Regulating the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical System in Mothers and Newborns in the Democratic Republic of Congo. *Child Dev*, 87 (1):61-72.
- Khashan AS, McNamee R, Henriksen TB, Pedersen MG, Kenny LC, Abel KM, Mortensen PB. 2011. Risk of affective disorders following prenatal exposure to severe life events: a Danish population-based cohort study. *J Psychiatr Res*, 45 (7):879-885.
- Kirby LG, Allen AR, Lucki I. 1995. Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res*, 682 (1-2):189-196.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M, Mikoshiba K, Hata R, Ueda H, Handa N, Fukunaga R, Isaka Y, Kimura K, et al. 1989. Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage--immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience*, 31 (2):401-411.
- Koehl M, Darnaudery M, Dulluc J, Van Reeth O, Le Moal M, Maccari S. 1999. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J Neurobiol*, 40 (3):302-315.
- Koenigs M, Grafman J. 2009. The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behav Brain Res*, 201 (2):239-243.

- Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. 2004. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol Psychiatry*, 55 (4):367-375.
- Lajud N, Roque A, Cajero M, Gutierrez-Ospina G, Torner L. 2012. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hypo-responsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 37 (3):410-420.
- Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. 2009. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med*, 7:97.
- Lanfumeey L, Mongeau R, Cohen-Salmon C, Hamon M. 2008. Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, 32 (6):1174-1184.
- Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA, Seckl JR. 1996. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta*, 17 (2-3):169-172.
- Lasek-Bal A, Jedrzejowska-Szypulka H, Rozycka J, Bal W, Holeccki M, Dulawa J, Lewin-Kowalik J. 2015. Low Concentration of BDNF in the Acute Phase of Ischemic Stroke as a Factor in Poor Prognosis in Terms of Functional Status of Patients. *Med Sci Monit*, 21:3900-3905.
- Lee RM. 1995. Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther*, 66 (1):149-173.
- Lehmann J, Feldon J. 2000. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev Neurosci*, 11 (4):383-408.
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. 2000. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (20):11032-11037.
- Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupouy JP. 2001. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*, 142 (5):1692-1702.
- Levine J, Barak Y, Chengappa KN, Rapoport A, Rebey M, Barak V. 1999. Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. *Neuropsychobiology*, 40 (4):171-176.
- Levine S. 1994. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann N Y Acad Sci*, 746:275-288; discussion 289-293.
- Levine S, Huchton DM, Wiener SG, Rosenfeld P. 1991. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Dev Psychobiol*, 24 (8):547-558.
- Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR. 1996. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology*, 64 (6):412-418.
- Lew RA, Menon M. 1991. A user's guide to the T-test. *J Urol*, 146 (1):199-204.
- Li GL, Farooque M, Lewen A, Lennmyr F, Holtz A, Olsson Y. 2000. MAP2 and neurogranin as markers for dendritic lesions in CNS injury. An immunohistochemical study in the rat. *APMIS*, 108 (2):98-106.
- Liggins GC, Howie RN. 1972. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics*, 50 (4):515-525.
- Lindsberg PJ, Grau AJ. 2003. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke*, 34 (10):2518-2532.
- Liu F, Schafer DP, McCullough LD. 2009. TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods*, 179 (1):1-8.
- Liu L, Li A, Matthews SG. 2001. Maternal glucocorticoid treatment programs HPA regulation in adult offspring: sex-specific effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280 (5):E729-739.
- Lockridge A, Newland B, Printen S, Romero GE, Yuan LL. 2013. Head movement: a novel serotonin-sensitive behavioral endpoint for tail suspension test analysis. *Behav Brain Res*, 246:168-178.

- Lopez-Duran NL, Kovacs M, George CJ. 2009. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in depressed children and adolescents: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 34 (9):1272-1283.
- Louey S, Thornburg KL. 2005. The prenatal environment and later cardiovascular disease. *Early Hum Dev*, 81 (9):745-751.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*, 10 (6):434-445.
- Lyck L, Kroigard T, Finsen B. 2007. Unbiased cell quantification reveals a continued increase in the number of neocortical neurones during early post-natal development in mice. *Eur J Neurosci*, 26 (7):1749-1764.
- Maes M, Bosmans E, Meltzer HY, Scharpe S, Suy E. 1993. Interleukin-1 beta: a putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression? *Am J Psychiatry*, 150 (8):1189-1193.
- Maletic V, Robinson M, Oakes T, Iyengar S, Ball SG, Russell J. 2007. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Int J Clin Pract*, 61 (12):2030-2040.
- Mann HB, Whitney DR. 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18 (1):50-60.
- Manwani B, Liu F, Xu Y, Persky R, Li J, McCullough LD. 2011. Functional recovery in aging mice after experimental stroke. *Brain Behav Immun*, 25 (8):1689-1700.
- Marais L, van Rensburg SJ, van Zyl JM, Stein DJ, Daniels WM. 2008. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res*, 61 (1):106-112.
- Matthews K, Dalley JW, Matthews C, Tsai TH, Robbins TW. 2001. Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. *Synapse*, 40 (1):1-10.
- Matthews SG. 2001. Antenatal glucocorticoids and the developing brain: mechanisms of action. *Semin Neonatol*, 6 (4):309-317.
- Mayorga AJ, Lucki I. 2001. Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)*, 155 (1):110-112.
- McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, Meaney MJ. 1995. Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 84 (1):55-61.
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. 1991. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci*, 11 (11):3398-3411.
- Meijer OC, de Lange EC, Breimer DD, de Boer AG, Workel JO, de Kloet ER. 1998. Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in mdr1A P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology*, 139 (4):1789-1793.
- Meschia JF, Bushnell C, Boden-Albala B, Braun LT, Bravata DM, Chaturvedi S, Creager MA, Eckel RH, Elkind MS, Fornage M, Goldstein LB, Greenberg SM, Horvath SE, Iadecola C, Jauch EC, Moore WS, Wilson JA, American Heart Association Stroke C, Council on C, Stroke N, Council on Clinical C, Council on Functional G, Translational B, Council on H. 2014. Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 45 (12):3754-3832.
- Miller BR, Hen R. 2015. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr Opin Neurobiol*, 30:51-58.
- Mo B, Feng N, Renner K, Forster G. 2008. Restraint stress increases serotonin release in the central nucleus of the amygdala via activation of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Res Bull*, 76 (5):493-498.
- Molnar J, Howe DC, Nijland MJ, Nathanielsz PW. 2003. Prenatal dexamethasone leads to both endothelial dysfunction and vasodilatory compensation in sheep. *J Physiol*, 547 (Pt 1):61-66.

- Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M. 1996. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res*, 26 (3):235-269.
- Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Koehl M, Casolini P, Van Reeth O, Maccari S. 2003. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. *Brain Research*, 989 (2):246-251.
- Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Mocaer E, Froger N, Lanfumey L, Laviola G, Casolini P, Zuena AR, Marzano L, Hamon M, Maccari S. 2004. Chronic treatment with imipramine reverses immobility behaviour, hippocampal corticosteroid receptors and cortical 5-HT(1A) receptor mRNA in prenatally stressed rats. *Neuropharmacology*, 47 (6):841-847.
- Morris PL, Robinson RG, Raphael B, Hopwood MJ. 1996. Lesion location and poststroke depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 8 (4):399-403.
- Mueller BR, Bale TL. 2008. Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *J Neurosci*, 28 (36):9055-9065.
- Mulligan CJ, D'Errico NC, Stees J, Hughes DA. 2012. Methylation changes at NR3C1 in newborns associate with maternal prenatal stress exposure and newborn birth weight. *Epigenetics*, 7 (8):853-857.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev*, 5 (1):25-44.
- Muneoka K, Mikuni M, Ogawa T, Kitera K, Kamei K, Takigawa M, Takahashi K. 1997. Prenatal dexamethasone exposure alters brain monoamine metabolism and adrenocortical response in rat offspring. *Am J Physiol*, 273 (5 Pt 2):R1669-1675.
- Murphy BE. 1977. Conversion of cortisol to cortisone by the human uterus and its reversal in pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 44 (6):1214-1217.
- NIH. 1995. Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. NIH Consensus Development Panel on the Effect of Corticosteroids for Fetal Maturation on Perinatal Outcomes. *JAMA*, 273 (5):413-418.
- Noorlander CW, De Graan PN, Middeldorp J, Van Beers JJ, Visser GH. 2006. Ontogeny of hippocampal corticosteroid receptors: effects of antenatal glucocorticoids in human and mouse. *J Comp Neurol*, 499 (6):924-932.
- Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM. 2008. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics*, 3 (2):97-106.
- Oitzl MS, Flutterm M, de Kloet ER. 1998. Acute blockade of hippocampal glucocorticoid receptors facilitates spatial learning in rats. *Brain Res*, 797 (1):159-162.
- Ouyang YB. 2013. Inflammation and stroke. *Neurosci Lett*, 548:1-3.
- Owens MJ, Nemeroff CB. 1991. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev*, 43 (4):425-473.
- Owens MJ, Nemeroff CB. 1999. Corticotropin-releasing factor antagonists in affective disorders. *Expert Opin Investig Drugs*, 8 (11):1849-1858.
- Palazidou E. 2012. The neurobiology of depression. *Br Med Bull*, 101:127-145.
- Palma-Gudiel H, Cordova-Palomera A, Leza JC, Fananas L. 2015. Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: A critical review. *Neurosci Biobehav Rev*, 55:520-535.
- Parati G, Esler M. 2012. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J*, 33 (9):1058-1066.
- Paschen W, Mies G, Hossmann KA. 1992. Threshold relationship between cerebral blood flow, glucose utilization, and energy metabolites during development of stroke in gerbils. *Exp Neurol*, 117 (3):325-333.
- Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. 1990. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 2 (2):161-192.
- Peters DAV. 1982. Prenatal Stress - Effects on Brain Biogenic-Amine and Plasma-Corticosterone Levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 17 (4):721-725.

- Petrik D, Lagace DC, Eisch AJ. 2012. The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building? *Neuropharmacology*, 62 (1):21-34.
- Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Drabant EM, Verchinski BA, Munoz KE, Kolachana BS, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Weinberger DR. 2005. 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci*, 8 (6):828-834.
- Plotsky PM, Meaney MJ. 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 18 (3):195-200.
- Plotsky PM, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. 2005. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology*, 30 (12):2192-2204.
- Popp A, Jaenisch N, Witte OW, Frahm C. 2009. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One*, 4 (3):e4764.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266 (5604):730-732.
- Porsolt RD, Deniel M, Jalfre M. 1979. Forced swimming in rats: hypothermia, immobility and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol*, 57 (4):431-436.
- Pruessner JC, Kirschbaum C, Meinlschmid G, Hellhammer DH. 2003. Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinology*, 28 (7):916-931.
- Rankin J. 1957. Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60. II. Prognosis. *Scott Med J*, 2 (5):200-215.
- Rayen I, van den Hove DL, Prickaerts J, Steinbusch HW, Pawluski JL. 2011. Fluoxetine during development reverses the effects of prenatal stress on depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis in adolescence. *PLoS One*, 6 (9):e24003.
- Renard GM, Rivarola MA, Suarez MM. 2007. Sexual dimorphism in rats: effects of early maternal separation and variable chronic stress on pituitary-adrenal axis and behavior. *Int J Dev Neurosci*, 25 (6):373-379.
- Reul JM, de Kloet ER. 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117 (6):2505-2511.
- Robinson RG, Jorge RE. 2016. Post-Stroke Depression: A Review. *Am J Psychiatry*, 173 (3):221-231.
- Roghair RD, Lamb FS, Miller FJ, Jr., Scholz TD, Segar JL. 2005a. Early gestation dexamethasone programs enhanced postnatal ovine coronary artery vascular reactivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288 (1):R46-53.
- Roghair RD, Segar JL, Sharma RV, Zimmerman MC, Jagadeesha DK, Segar EM, Scholz TD, Lamb FS. 2005b. Newborn lamb coronary artery reactivity is programmed by early gestation dexamethasone before the onset of systemic hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289 (4):R1169-1176.
- Roque S, Mesquita AR, Palha JA, Sousa N, Correia-Neves M. 2014. The behavioral and immunological impact of maternal separation: a matter of timing. *Front Behav Neurosci*, 8:192.
- Roque S, Oliveira TG, Nobrega C, Barreira-Silva P, Nunes-Alves C, Sousa N, Palha JA, Correia-Neves M. 2011. Interplay between Depressive-Like Behavior and the Immune System in an Animal Model of Prenatal Dexamethasone Administration. *Front Behav Neurosci*, 5:4.
- Salaycik KJ, Kelly-Hayes M, Beiser A, Nguyen AH, Brady SM, Kase CS, Wolf PA. 2007. Depressive symptoms and risk of stroke: the Framingham Study. *Stroke*, 38 (1):16-21.
- Salm AK, Pavelko M, Krouse EM, Webster W, Kraszpulski M, Birkle DL. 2004. Lateral amygdaloid nucleus expansion in adult rats is associated with exposure to prenatal stress. *Brain Res Dev Brain Res*, 148 (2):159-167.
- Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J. 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol*, 61 (2):133-168.

- Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, Vale W. 1987. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*, 238 (4826):522-524.
- Sapolsky RM, Meaney MJ. 1986. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res*, 396 (1):64-76.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*, 21 (1):55-89.
- Schaar KL, Brennehan MM, Savitz SI. 2010. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med*, 2 (1):13.
- Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. 1998a. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke*, 29 (10):2162-2170.
- Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ, Garcia JH. 1998b. A Critical Reevaluation of the Intraluminal Thread Model of Focal Cerebral Ischemia : Evidence of Inadvertent Premature Reperfusion and Subarachnoid Hemorrhage in Rats by Laser-Doppler Flowmetry Editorial Comment: Evidence of Inadvertent Premature Reperfusion and Subarachnoid Hemorrhage in Rats by Laser-Doppler Flowmetry. *Stroke*, 29 (10):2162-2170.
- Schmidt M, Enthoven L, van der Mark M, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS. 2003. The postnatal development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the mouse. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 21 (3):125-132.
- Schmidt MV, Levine S, Oitzl MS, van der Mark M, Muller MB, Holsboer F, de Kloet ER. 2005. Glucocorticoid receptor blockade disinhibits pituitary-adrenal activity during the stress hyporesponsive period of the mouse. *Endocrinology*, 146 (3):1458-1464.
- Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. 2011. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Springer-Lehrbuch. 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 436-461.
- Schwab M. 2009. [Intrauterine programming of disorders of brain function in later life]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch*, 49 (1):13-28.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Zwiener U, Bauer R. 1998. Brain-derived peptides reduce the size of cerebral infarction and loss of MAP2 immunoreactivity after focal ischemia in rats. *J Neural Transm Suppl*, 53:299-311.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Kuhn B, Muller T, Schubert H, Walter B, Sliwka U, Nathanielsz PW. 2001. Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep. *J Physiol*, 530 (Pt 3):497-506.
- Seckl JR. 2004. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol*, 151 Suppl 3:U49-62.
- Seckl JR, Meaney MJ. 2004. Glucocorticoid programming. *Ann N Y Acad Sci*, 1032:63-84.
- Shapiro SS, Wilk MB, Chen HJ. 1968. A Comparative Study of Various Tests for Normality. *Journal of the American Statistical Association*, 63 (324):1343-1372.
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. 1996. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (9):3908-3913.
- Shimoda K, Robinson RG. 1999. The relationship between poststroke depression and lesion location in long-term follow-up. *Biol Psychiatry*, 45 (2):187-192.
- Shoener JA, Baig R, Page KC. 2006. Prenatal exposure to dexamethasone alters hippocampal drive on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adult male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290 (5):R1366-1373.
- Singh VB, Corley KC, Phan TH, Boadle-Biber MC. 1990. Increases in the activity of tryptophan hydroxylase from rat cortex and midbrain in response to acute or repeated sound stress are blocked by adrenalectomy and restored by dexamethasone treatment. *Brain Res*, 516 (1):66-76.

- Slotten HA, Kalinichev M, Hagan JJ, Marsden CA, Fone KC. 2006. Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. *Brain Res*, 1097 (1):123-132.
- Sofroniew MV. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32 (12):638-647.
- Spalletta G, Bossu P, Ciaramella A, Bria P, Caltagirone C, Robinson RG. 2006. The etiology of poststroke depression: a review of the literature and a new hypothesis involving inflammatory cytokines. *Mol Psychiatry*, 11 (11):984-991.
- Spearman C. 1987. The proof and measurement of association between two things. By C. Spearman, 1904. *Am J Psychol*, 100 (3-4):441-471.
- Spulber S, Conti M, DuPont C, Raciti M, Bose R, Onishchenko N, Ceccatelli S. 2015. Alterations in circadian entrainment precede the onset of depression-like behavior that does not respond to fluoxetine. *Transl Psychiatry*, 5:e603.
- Staud F, Mazancova K, Miksik I, Pavek P, Fendrich Z, Pacha J. 2006. Corticosterone transfer and metabolism in the dually perfused rat placenta: effect of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Placenta*, 27 (2-3):171-180.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 85 (3):367-370.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. 2002. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol*, 513:87-113.
- Sun K, Adamson SL, Yang K, Challis JR. 1999. Interconversion of cortisol and cortisone by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases type 1 and 2 in the perfused human placenta. *Placenta*, 20 (1):13-19.
- Sweet D, Bevilacqua G, Carnielli V, Greisen G, Plavka R, Saugstad OD, Simeoni U, Speer CP, Valls ISA, Halliday H, Working Group on Prematurity of the World Association of Perinatal M, European Association of Perinatal M. 2007. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome. *J Perinat Med*, 35 (3):175-186.
- Szuran TF, Pliska V, Pokorny J, Welzl H. 2000. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiology & Behavior*, 71 (3-4):353-362.
- Takagi K, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD. 1995. Local hemodynamic changes during transient middle cerebral artery occlusion and recirculation in the rat: a [¹⁴C]iodoantipyrine autoradiographic study. *Brain Res*, 691 (1-2):160-168.
- Takahashi LK, Turner JG, Kalin NH. 1992. Prenatal stress alters brain catecholaminergic activity and potentiates stress-induced behavior in adult rats. *Brain Res*, 574 (1-2):131-137.
- Talge NM, Neal C, Glover V, Early Stress TR, Prevention Science Network F, Neonatal Experience on C, Adolescent Mental H. 2007. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J Child Psychol Psychiatry*, 48 (3-4):245-261.
- Tamura A, Graham DJ, McCulloch J, Teasdale GM. 1981. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1 (1):53-60.
- Tata DA, Markostamou I, Ioannidis A, Gkioka M, Simeonidou C, Anogianakis G, Spandou E. 2015. Effects of maternal separation on behavior and brain damage in adult rats exposed to neonatal hypoxia-ischemia. *Behav Brain Res*, 280:51-61.
- Tobin MK, Bonds JA, Minshall RD, Pelligrino DA, Testai FD, Lazarov O. 2014. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34 (10):1573-1584.
- Togher KL, Togher KL, O'Keefe MM, O'Keefe MM, Khashan AS, Khashan AS, Gutierrez H, Gutierrez H, Kenny LC, Kenny LC, O'Keefe GW, O'Keefe GW. 2014. Epigenetic regulation of the placental HSD11B2 barrier and its role as a critical regulator of fetal development. *Epigenetics*, 9 (6):816-822.
- Tomfohr LM, Martin TM, Miller GE. 2008. Symptoms of depression and impaired endothelial function in healthy adolescent women. *J Behav Med*, 31 (2):137-143.

- Tractenberg SG, Levandowski ML, de Azeredo LA, Orso R, Roithmann LG, Hoffmann ES, Brenhouse H, Grassi-Oliveira R. 2016. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*, 68:489-503.
- Tuglu C, Kara SH, Caliyurt O, Vardar E, Abay E. 2003. Increased serum tumor necrosis factor-alpha levels and treatment response in major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl)*, 170 (4):429-433.
- Tureyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Dempsey RJ. 2004. Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. *J Neurosci Methods*, 139 (2):203-207.
- van Bodegom M, Homberg JR, Henckens M. 2017. Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Front Cell Neurosci*, 11:87.
- Van den Bergh BR, Van Calster B, Smits T, Van Huffel S, Lagae L. 2008. Antenatal maternal anxiety is related to HPA-axis dysregulation and self-reported depressive symptoms in adolescence: a prospective study on the fetal origins of depressed mood. *Neuropsychopharmacology*, 33 (3):536-545.
- van der Heyden JA, Molewijk E, Olivier B. 1987. Strain differences in response to drugs in the tail suspension test for antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)*, 92 (1):127-130.
- van Lieshout JJ, Secher NH. 2008. Point:Counterpoint: Sympathetic activity does/does not influence cerebral blood flow. Point: Sympathetic activity does influence cerebral blood flow. *J Appl Physiol* (1985), 105 (4):1364-1366.
- van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, van Gijn J. 1988. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke*, 19 (5):604-607.
- Vazquez DM, Van Oers H, Levine S, Akil H. 1996. Regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNAs in the hippocampus of the maternally deprived infant rat. *Brain Res*, 731 (1-2):79-90.
- Veldhuis HD, Van Koppen C, Van Ittersum M, De Kloet ER. 1982. Specificity of the adrenal steroid receptor system in rat hippocampus. *Endocrinology*, 110 (6):2044-2051.
- Videbech P, Ravnikilde B. 2004. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry*, 161 (11):1957-1966.
- Vieau D, Sebaai N, Leonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Molendi-Coste O, Laborie C, Breton C, Deloof S, Lesage J. 2007. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. *Psychoneuroendocrinology*, 32 Suppl 1:S16-20.
- Viltart O, Vanbesien-Mailliot CC. 2007. Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. *ScientificWorldJournal*, 7:1493-1537.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA. 2007. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*, 184 (1-2):53-68.
- Ward HE, Johnson EA, Salm AK, Birkle DL. 2000. Effects of prenatal stress on defensive withdrawal behavior and corticotropin releasing factor systems in rat brain. *Physiol Behav*, 70 (3-4):359-366.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. 1985. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*, 17 (5):497-504.
- Watson JB, Mednick SA, Huttunen M, Wang X. 1999. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Dev Psychopathol*, 11 (3):457-466.
- Weinstock M. 2007. Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour. *Neurochem Res*, 32 (10):1730-1740.
- Weinstock M. 2008. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev*, 32 (6):1073-1086.
- Weinstock M, Matlina E, Maor GI, Rosen H, McEwen BS. 1992. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. *Brain Res*, 595 (2):195-200.

- Weinstock M, Poltyrev T, Schorer-Apelbaum D, Men D, McCarty R. 1998. Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. *Physiol Behav*, 64 (4):439-444.
- Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. 2001. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience*, 104 (1):71-79.
- Whitten WK. 1958. Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male; changes in the oestrous cycle determined by vaginal smears. *J Endocrinol*, 17 (3):307-313.
- Wigger A, Neumann ID. 1999. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav*, 66 (2):293-302.
- Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Bottner M, Rosewell KL. 2001. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. *Brain Res Brain Res Rev*, 37 (1-3):313-319.
- Workel JO, Oitzl MS, Fluttert M, Lesscher H, Karszen A, de Kloet ER. 2001. Differential and age-dependent effects of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of brown norway rats from youth to senescence. *J Neuroendocrinol*, 13 (7):569-580.
- Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. 2006. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation*, 113 (17):2105-2112.
- Young JB. 2002. Programming of sympathoadrenal function. *Trends Endocrinol Metab*, 13 (9):381-385.
- Zhang L, Schallert T, Zhang ZG, Jiang Q, Arniago P, Li Q, Lu M, Chopp M. 2002. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Methods*, 117 (2):207-214.
- Zimmermann E, Critchlow V. 1967. Effects of diurnal variation in plasma corticosterone levels on adrenocortical response to stress. *Proc Soc Exp Biol Med*, 125 (2):658-663.

9 ANHANG

9.1 Färbeprotokolle

Nachfolgend ist das Protokoll für die Durchführung der Kresylviolett-Färbung aufgeführt.

Färbeprotokoll für Kresylviolett-Gefrierschnitte	
1. Schnitte entparaffinieren und mit destilliertem Wasser rehydratisieren	5 min
2. Färben mit Kresylviolett-Lösung (300 ml destilliertes Wasser, 1,6326 g Natriumacetat, 2,88 ml Eisessig, 100 mg Kresylviolett) ca. 15 min bei 60 °C lösen und filtrieren)	5 min bei 60 °C
3. Destilliertes Wasser	Kurz spülen
4. Isopropanol 70 %	2 x je 3 min
5. Isopropanol 96 %	2 x je 3 min
6. Isopropanol 100 %	2 x je 5 min
7. Xylol	5 min
8. Xylol	10 min
9. Balsameinschluss	

Nachfolgend sind die Protokolle für die immunhistochemischen Färbungen MAP2 und GFAP dargestellt.

Färbeprotokoll für MAP2- und GFAP-Gefrierschnitte			
Tag 1	Tris-Buffered Saline (50 mM + 150 mM NaCl)		O/N
	Tris-Buffered Saline with tween (TBS-T))		3 x 15 min
	0,24% H ₂ O ₂ (200µl 30% H ₂ O ₂ in 25 ml TBS-T) <i>mit Sieb</i>		30 min
	TBS-T		3x 15 min
Schritt nur im Falle MAP2 nötig	Vorinkubation mit: <i>ohne Sieb</i>	3 % Normal donkey serum (NDS) 2 % Rinderserumalbumin (BSA) 3 % Milchpulver 1: 200 Fab-Fragment	2 h bei Raumtemper atur
	TBS-T		3x 15 min
	Primärer Antikörper: MAP2-Färbung: monoclonal mouse anti MAP2 (2a+2b), clone AP-20, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) GFAP-Färbung: GFAP (Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland) Verdünnung jeweils 1:10000 in 3 % NDS <i>ohne Sieb</i>		O/N, 4 °C

Tag 2	TBS-T	3 x 15 min
	3 % NDS <i>mit Sieb</i>	15 min
	Sekundärer Antikörper:	2 h bei

<p>MAP2-Färbung:</p> <p>Donkey anti mouse, biotinyliert (Dianova, Hamburg, Deutschland)</p> <p>GFAP-Färbung:</p> <p>Donkey anti rabbit, (Dianova, Hamburg, Deutschland)</p> <p>Verdünnung jeweils 1:500 in 3 % NDS</p> <p><i>ohne Sieb</i></p>	Raumtemperatur
TBS-T	3 x 15 min
<p>AB-Komplex (50 µl Reagenz A + 50 µl Reagenz B in 2,5 ml TBS-T), 30min vor Gebrauch ansetzen (ABC Standard Kit, Vectorlab, PK-6100)</p> <p><i>ohne Sieb</i></p>	1 h
TBS-T	3 x 15 min
<p>DAB-Reaktion (je 1 Tablette DAB bzw. H₂O₂ in 5 ml TBS-T lösen)</p> <p><i>ohne Sieb</i></p>	15 min
TBS-T	3 x 60 min

9.2 Deskriptive Statistik zur Corticosteron-Stressantwort

Geschlecht	Gruppe		Basalwert [ng/ml]	Peakwert [ng/ml]	Abklingwert [ng/ml]	AUC-Antwort [(ng/ml)*min]	Peak-Anstieg [ng/ml]	Peak-Abfall [ng/ml]	
Weiblich	k	N	12	12	12	12	12	12	
		Median	363,13	690,13	367,10	17746,00	292,14	374,19	
		Minimum	84	377	182	7592	143	45	
		Maximum	591	855	570	38428	537	484	
		Perzentil	25	256,23	630,03	286,95	14095,25	243,72	211,70
			50	363,13	690,13	367,10	17746,00	292,14	374,19
			75	528,88	761,46	412,00	26689,00	380,53	425,20
		GC (E16/17)	N	13	13	13	13	13	13
			Median	243,53	713,10	338,77	35728,00	509,87	394,09
	Minimum		53	570	51	3902	75	136	
	Maximum		594	888	493	46150	617	703	
	Perzentil		25	122,39	639,28	260,32	24469,50	452,03	256,97
			50	243,53	713,10	338,77	35728,00	509,87	394,09
		75	378,43	823,83	448,59	42107,50	576,04	556,60	
	MS	N	12	12	12	12	12	12	
Median		110,26	713,61	295,44	36287,00	583,95	459,36		
Minimum		10	482	69	15198	267	3		
Maximum		305	1029	479	71196	1019	688		
Perzentil		25	56,22	595,08	162,71	26878,75	411,25	289,67	
		50	110,26	713,61	295,44	36287,00	583,95	459,36	
	75	215,21	829,73	425,03	54143,50	758,69	663,82		

Geschlecht	Gruppe		Basalwert [ng/ml]	Peakwert [ng/ml]	Abklingwert [ng/ml]	AUC-Antwort [(ng/ml)*min]	Peak-Anstieg [ng/ml]	Peak-Abfall [ng/ml]	
Männlich	k	N	7	7	7	7	7	7	
		Median	134,29	394,57	198,92	18353,00	284,73	204,63	
		Minimum	73	277	72	2494	99	148	
		Maximum	203	473	264	26223	341	277	
		Perzentil	25	96,16	365,81	111,27	8081,00	185,32	147,79
			50	134,29	394,57	198,92	18353,00	284,73	204,63
			75	177,76	419,72	246,92	25969,00	321,35	273,90
		GC (E16/17)	N	6	6	6	6	6	6
			Median	105,55	327,09	136,78	14489,50	212,99	186,81
	Minimum		91	304	125	7864	131	143	
	Maximum		174	343	189	17037	252	207	
	Perzentil		25	99,45	305,18	126,61	9385,75	161,33	152,65
			50	105,55	327,09	136,78	14489,50	212,99	186,81
		75	156,16	343,27	159,67	16872,75	243,66	206,37	
	MS	N	9	9	9	9	9	9	
Median		91,00	339,29	68,06	15077,00	212,52	252,64		
Minimum		63	211	43	7025	143	117		
Maximum		156	416	226	20073	353	359		
Perzentil		25	70,80	286,76	52,72	8850,50	180,01	150,33	
		50	91,00	339,29	68,06	15077,00	212,52	252,64	
	75	125,39	377,36	148,67	18534,00	278,42	276,46		

9.3 Danksagung

Folgenden Personen, die mich während der Erstellung dieser Arbeit gefördert und gefordert haben, möchte ich an dieser Stelle danken:

- Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schwab, Leiter der Arbeitsgruppe Fetale Programmierung, für die Überlassung des Themas sowie für Ratschläge und Denkanstöße bei der Erstellung des Manuskripts.
- Herrn Dr. med. Christoph Bergmeier, der mich in das wissenschaftliches Arbeiten einführte und mir während der Durchführung der Versuche sowie bei Datenauswertung und -Interpretation mit Rat und Tat zur Seite stand.
- Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Fetale Programmierung, stellvertretend Frau Claudia Sommer und Frau Ina Ingrisch, für ihr jederzeit offenes Ohr und die Unterstützung bei den Experimenten.
- Meinen Kommilitonen Hannelore und Mathias für unzählige konstruktive Diskussionen und einander aufbauende Gespräche.

Ein außerordentlicher Dank gilt zu guter Letzt meinem Vater Klaus für sein hartnäckiges und aufrichtiges Interesse an meiner Arbeit sowie meiner Ehefrau Madlin für ihre Geduld und ihren Zuspruch.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

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

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, 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: Herr Prof. Dr. med. Matthias Schwab und Herr Dr. med. Christoph Bergmeier,

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.

Weimar, 07.04.2018

Franz Krönert