

Aus der Neurologischen Klinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Über den Einfluss einer kontinuierlichen tiefen Hirnstimulation des  
pedunkulopontinen tegmentalen Nucleus auf motorische Defizite in einem Ratten-  
Schlaganfallmodell**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von

Arne Bohr

aus Lüneburg

Würzburg, Dezember 2021



**Referent:** Priv.-Doz. Dr. med. Felix Fluri

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Philip Tovote

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 08.04.2022

**Der Promovend ist Arzt.**

## Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	1
Der ischämische Schlaganfall.....	1
Klinische Bedeutung.....	1
Etablierte und experimentelle Therapieansätze.....	2
Tiefe Hirnstimulation .....	3
Der pedunkulopontine tegmentale Nucleus .....	7
Fragestellung und Zielsetzung .....	10
Material und Methoden .....	10
Ethik- und Tierversuchsvotum .....	10
Tiere .....	10
Induktion eines Schlaganfalls mittels Photothrombose.....	10
Implantation der Mikroelektrode .....	11
Elektrische Stimulation .....	14
Verhaltenstests .....	17
Beam-Walking-Test .....	17
Ladder-Rung-Walking-Test.....	18
Zeitlicher Ablauf .....	20
Histologische Auswertung .....	20
Statistische Analyse .....	22
Ergebnisse.....	23
Verhalten der Tiere im Versuchsprotokoll .....	23
Photothrombose.....	25
Elektrische Stimulation .....	28

Histologische Untersuchungen .....	28
Beam-Walking- und Ladder-Rung-Walking-Test .....	32
Diskussion .....	34
Einschränkungen dieser Arbeit .....	37
Zusammenfassung .....	38
Literaturverzeichnis .....	40

## Einleitung

### Der ischämische Schlaganfall

#### Klinische Bedeutung

Die Auswertung der „Global Burden of Disease Study 2010“ ergab, dass weltweit die Anzahl ischämischer Schlaganfälle in dem Zeitraum von 1990 bis 2010 signifikant angestiegen ist, sowie die damit einhergehenden Todesfälle und Behinderungen (Krishnamurthi et al. 2013). Im Jahr 2013 stellte der Schlaganfall global die zweithäufigste Todesursache nach der ischämischen Herzerkrankung dar (Feigin, Norrving, and Mensah 2017). Zudem stand der Schlaganfall im selben Jahr an dritter Stelle der Ursachen einer körperlichen Behinderung mit 4,5% der DALYs (disability-adjusted life years). In einer Studie von Rathore et al. wurden Schlaganfälle hinsichtlich der Ursache (ischämisch vs. hämorrhagisch) und ihres klinischen Bildes näher untersucht. Von 474 festgestellten Schlaganfällen waren etwa 85% ischämisch bedingt (Rathore et al. 2002). Dagegen handelte es sich bei circa 15% um einen hämorrhagischen Insult. Bei einem großen Teil der Fälle (81,6%) waren Paresen als Schlaganfallfolge zu beobachten; Gangstörungen traten bei 10,8% der Patienten auf. Weitere häufige Symptome nach Schlaganfall waren Sensibilitätsstörungen (44,5%), Sprachstörungen (24%) und Kopfschmerzen (27,4%). Der Anteil von ischämischen Schlaganfällen an der Gesamtzahl von Schlaganfällen stellt sich in anderen Studien ähnlich hoch dar (Benjamin et al. 2017). Einer Publikation aus dem Jahr 2006 zufolge beliefen sich die direkten Kosten für die gesamte Behandlung eines Patienten mit ischämischem Schlaganfall in Deutschland auf durchschnittlich 43.129 Euro (Stand 2004) (Kolominsky-Rabas et al. 2006). Diese hohen Kosten werden vor allem auf die hohe Prävalenz der Erkrankung, aber auch auf den erhöhten Bedarf an dauerhafter medizinischer Versorgung nach einem Schlaganfall zurückgeführt. In einer Arbeit von Rudberg et al. wurde festgestellt, dass der Behinderungsgrad 6 Monate nach einem Schlaganfall prognostische Aussagen über die gesundheitsbezogene Lebensqualität

sowie zu dem Gesamtüberleben und den krankheitsbezogenen Kosten 18 Monate bzw. 36 Monate nach dem Insult erlaubt (Rudberg et al. 2018). Hieraus folgern die Autoren, dass sich die Gesamtkrankheitslast und die damit verbundenen Kosten effektiv reduzieren lassen könnten durch die Anwendung früher Interventionen, welche den funktionellen Status innerhalb der ersten sechs Monate nach einem Schlaganfall verbessern.

#### Etablierte und experimentelle Therapieansätze

Die Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls sieht unter Berücksichtigung bestimmter Zeitfenster nach Beginn der Symptomatik die Revaskularisierung vor, also die Wiederherstellung einer ausreichenden Blutversorgung des betroffenen Hirngebiets. Zu den beiden erfolgreichsten Verfahren, wie sie auch in der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie empfohlen werden, gehört zum einem die sogenannte Lyse-Therapie, womit die intravenöse Gabe von Alteplase bzw. rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator) gemeint ist (Ringleb et al. 2015). Hierdurch soll der intravasale Thrombus aufgelöst werden. Daneben besteht die Möglichkeit, Thromben, welche im Bereich großer arterieller Hirngefäße einen Verschluss der Strombahn verursachen, mechanisch über einen Gefäßzugang z.B. mithilfe eines „Stent-Retrievers“ zu entfernen (Ringleb et al. 2015). Sowohl für die intravenöse thrombolytische Therapie, als auch für die mechanische Thrombektomie konnte in großen Studien ein signifikant verbessertes klinisches Ergebnis nach einem ischämischen Schlaganfall aufgezeigt werden (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group 1995; Hacke et al. 2004; Emberson et al. 2014; Rha and Saver 2007; Broderick et al. 2013; Goyal et al. 2015). Trotz des Einsatzes dieser Akuttherapien zur Wiederherstellung der Blutversorgung stellen ischämische Schlaganfälle nach wie vor eine wesentliche Ursache für langfristige Behinderungen dar (Krishnamurthi et al. 2013). Darüber hinaus besteht für Patienten, denen aufgrund vorhandener Kontraindikationen keine der oben genannten Therapien angeboten werden kann, keine gleichwertige Alternative. Insofern besteht ein hoher Bedarf für neue Therapieoptionen. Um die natürlich vorhandene, allerdings begrenzte

und ungenügende Regeneration nach einem Schlaganfall zu verbessern, werden verschiedene therapeutische Ansätze untersucht und weiterverfolgt (Cramer 2008a; Cramer 2008b; Richards and Cramer 2021). In klinischen Studien konnte ein positiver Effekt durch die pharmakologische Therapie mit CDP-Cholin bestätigt werden, jedoch blieb die erzielte Verbesserung durch CDP-Cholin-Gabe innerhalb von 24 Stunden nach Beginn der Symptomatik hinter dem Effekt der oben beschriebenen Akuttherapien zurück (Secades et al. 2016). Der Einsatz neurotropher Substanzen wie beispielsweise Erythropoietin (EPO) zeigte in Tierversuchen neuroprotektive Effekte (Sirén et al. 2001). Allerdings kam die bislang größte klinische Studie (German Multicenter EPO Stroke Trial) zu dem Ergebnis, dass der Einsatz von EPO bei Schlaganfallpatienten mit einer erhöhten Mortalität unklarer Genese einhergeht (Ehrenreich et al. 2009). Neben pharmakologischen Therapieversuchen gibt es auch Ansätze zu neuromodulatorischen Therapieformen. Die invasive Stimulation des Ganglion sphenopalatinum wird durchgeführt mit der Absicht, den Blutfluss über Kollateralgefäße zu erhöhen (Bornstein et al. 2019). In einer randomisierten, kontrollierten Studie von Bornstein et al. konnte ein kleiner, jedoch nicht signifikanter Vorteil durch diese Therapie erzielt werden. Einen weiteren potentiellen Therapieansatz stellt die Neuromodulation mittels tiefer Hirnstimulation dar.

### Tiefe Hirnstimulation

Tiefe Hirnstimulation (THS) bezeichnet ein Verfahren, bei welchem zu therapeutischen Zwecken eine Elektrode in das Gehirn implantiert wird, um dort eine elektrische Stimulation durchzuführen. Etabliert ist diese Methode bereits zur Behandlung motorischer Beschwerden bei dem Morbus Parkinson, dem essentiellen Tremor sowie der Dystonie (Herrington, Cheng, and Eskandar 2016). In einer Arbeit von Shen et al. wurde an Hirnschnitten von Ratten der Effekt von hochfrequenter THS im Nucleus subthalamicus (STN) in Bezug auf Plastizität untersucht, indem die Reizantwort der Neurone mittels Patch-Clamp-Technik abgeleitet wurde. Die Studie zeigte, dass hochfrequente Stimulation von STN-Neuronen sowohl eine Kurzzeit- als auch eine Langzeitpotenzierung bewirken kann, zudem aber auch eine Langzeit-Depression.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass THS im STN langanhaltende Veränderungen im Nervensystem bewirken kann und dass neuronale Plastizität einen möglichen Wirkmechanismus der THS darstellt (Shen et al. 2003). Weiterführende Tierversuche ergaben, dass die elektrische Stimulation eines betroffenen kortikalen Arealen nach einem Schlaganfall bei gleichzeitiger Physiotherapie zu einer verbesserten Rehabilitation führen kann (Kleim et al. 2003; Plautz et al. 2003; Teskey et al. 2003). Die dabei zugrundeliegende Hypothese, durch elektrische Stimulation die Neuausbildung von Synapsen zwischen noch vorhandenen Neuronen zu fördern und somit die Regeneration auf Zellebene zu verbessern, konnte ebenfalls tierexperimentell erhärtet werden (Adkins, Hsu, and Jones 2008): In der Studie von Adkins et al. erhielten Ratten nach induziertem Schlaganfall im sensomotorischen Kortex eine kortikale Stimulation im Bereich des perilesionellen motorischen Kortex. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung des stimulierten, perilesionellen Kortex zeigte eine erhöhte Synapsendichte. Die Forscher schlussfolgerten, dass ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Synapsendichte im perilesionellen Kortex und der Erholung motorischer Defizite bestehe. Auch in frühen klinischen Studien mit Schlaganfallpatienten wurde durch die Kombination aus Physiotherapie mit kortikaler Stimulation ein positiver Effekt auf die motorischen Defizite gesehen (Levy et al. 2008; Huang et al. 2008). Jedoch konnte in einer Phase III-Studie kein Vorteil der kortikalen Stimulation und Physiotherapie verglichen mit alleiniger Physiotherapie nachgewiesen werden (Plow et al. 2009). Es wird angenommen, dass bestimmte Unterschiede zwischen dem ischämischen Schlaganfall beim Menschen und dem Schlaganfall-Modell bei Versuchstieren die Translation des Verfahrens erschweren (Plow et al. 2009). Ein relevanter Unterschied liegt darin, dass die artifiziellen Schlaganfälle im Tiermodell eine klar abgegrenzte Läsion im Bereich des motorischen Kortex umfassen (Plautz et al. 2003; Teskey et al. 2003). Beim Menschen hingegen kann das Infarktvolumen im Bereich motorischer Regionen groß und das perilesionelle, noch funktionsfähige (motorische) Areal dazu verhältnismäßig klein sein. Somit steht für den Reorganisationsprozess nur noch ein relativ kleines (motorisches) Areal zur Verfügung, was beim Menschen das geringe Erholungspotential nach Schlaganfall erklären könnte

(Machado and Baker 2012). Während bei Nagern um den kortikalen Infarkt eine erhöhte Aktivität molekularer Prozesse zu beobachten ist, findet man bei Schlaganfallpatienten um einen kortikalen Infarkt eine verringerte Aktivität trotz Verbesserung der Defizite (Cramer et al. 2006; Binkofski and Seitz 2004). Mithilfe von funktioneller Magnet-Resonanz-Tomographie (fMRT) und/oder Diffusions-Tensor-Bildgebung (DTI von „diffusion tensor imaging“), eine spezielle Form der diffusionsgewichteten Magnet-Resonanz-Tomographie, konnte man weiterhin feststellen, dass an die Läsion angrenzende neuronale Strukturen die Funktion des untergegangenen Gewebes bei einem Infarkt der Corona radiata übernehmen (Jang et al. 2006; Kwon et al. 2007). Des Weiteren konnten verschiedene Studien zeigen, dass auch intakt gebliebene Netzwerke der betroffenen Seite für die Reorganisation nach einem ischämischen Schlaganfall genutzt werden (Gerloff et al. 2006; Hamzei et al. 2006; Richards et al. 2008), ebenso wie Areale der kontralateralen Hemisphäre (Jang et al. 2005; Ward et al. 2007; Lotze et al. 2006). Darüber hinaus konnten Interaktionen zwischen den Hemisphären nachgewiesen werden, die im Rahmen von physiotherapeutischen Interventionen mit einer Verbesserung der motorischen Defizite assoziiert waren (Stinear et al. 2008; Takeuchi et al. 2008). Welcher Mechanismus zu welchem Anteil an der Regeneration beteiligt ist, kann je nach Ort des Schlaganfalls und Zeitpunkt der Regeneration variieren, was bei der Wahl der Rehabilitationsmaßnahme berücksichtigt werden sollte (Plow et al. 2009).

Mit der kortikalen Stimulation sollen über subdurale Elektroden die noch vorhandenen Strukturen, die das Infarktgewebe unmittelbar umgeben, moduliert werden. Eine mögliche Alternative, um den motorischen Kortex zu stimulieren, stellt die Stimulation von tiefer gelegenen motorischen Bahnen mit Verbindung zum motorischen Kortex dar (Plow and Machado 2014). Eine geeignete Zielstruktur für die elektrische Stimulation dürfte der Nucleus dentatus sein, welcher via Tractus dentatothalamicus und den sich anschließenden Bahnen mit dem motorischen Kortex in Verbindung steht. In einem Schlaganfallmodell mit Ratten konnte nach elektrischer Stimulation dieses Kerngebietes eine Verbesserung der motorischen Defizite gezeigt werden (Machado and Baker 2012). In einer klinischen Studie von Machado et al. (Machado, MD, PhD

2016, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02835443) wird aktuell untersucht, ob die Stimulation des Nucleus dentatus in Kombination mit Physiotherapie bei Schlaganfallpatienten eine Verbesserung der motorischen Defizite an der oberen Extremität (12-36 Monate nach Schlaganfall) erreicht werden kann. Die Hypothese, dass man durch Stimulation des Kleinhirns einen Effekt auf das Großhirn ausüben kann, basiert auf der Beobachtung, dass Kleinhirnfunktionen durch einen zerebralen Schlaganfall beeinträchtigt sein können (Machado and Baker 2012). Das Phänomen der „Crossed Cerebellar Diaschisis“ (=gekreuzte cerebelläre Diaschisis) beschreibt die Reduktion von Aktivität, Blutfluss und Metabolismus einer Kleinhirnhemisphäre, die auf einen Schaden der kontralateralen Großhirnhemisphäre und die dadurch veränderte Innervation des Kleinhirns zurückgeführt wird (Pantano et al. 1987; De Reuck et al. 1997; Srinivasan et al. 2004). Das Konzept der Diaschisis wurde bereits 1914 von Constantin von Monakow aufgestellt und beschreibt die Veränderung elektrophysiologischer Signale in einem Gebiet des zentralen Nervensystems (ZNS), welches in deutlicher Entfernung zu dem tatsächlich geschädigten Bereich liegt, aber mit diesem anatomisch verbunden ist (von Monakow C 1914). Auch neuere Studien bestätigen die Vermutung, dass fokale Schäden des ZNS - wie beispielsweise nach einem Schlaganfall - zu einer pathologischen Veränderung der Verknüpfungen innerhalb eines Netzwerkes führen können (Grefkes et al. 2008; Zhang et al. 2017).

Lozano et al. beschreiben in ihrer Arbeit ausführlich, bei welchen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen die THS eine mögliche therapeutische Option darstellen könnte. Diesem Konzept liegt zugrunde, dass man bei all diesen Erkrankungen dysfunktionale Signale innerhalb eines zerebralen Netzwerkes als mögliche Ursache der Beschwerden annimmt (Lozano and Lipsman 2013). Die THS schafft die Möglichkeit, über bestimmte Hirnbahnen pathologische Signale zu modulieren (Lozano and Lipsman 2013). Es besteht die Hypothese, dass durch die THS eine funktionelle und reversible Läsion des stimulierten Gebiets verursacht wird (Herrington, Cheng, and Eskandar 2016). Diese Annahme geht von der Beobachtung aus, dass THS mit hohen Frequenzen einen ähnlichen Effekt wie die ablativ Chirurgie derselben Regionen hat (Guridi and Lozano 1997; Jenike 1998). Anhand von Tierversuchen untersuchten

Jensen und Durand insbesondere die Wirkung von hochfrequenter Stimulation auf axonale Strukturen. Die Ergebnisse legten einen frequenzabhängigen Effekt der Stimulation auf die Nervenbahnen nahe, wobei mit Steigerung der Frequenz eine Blockade der Reizweiterleitung beobachtet wurde (Jensen and Durand 2009). McIntyre et al. vermuteten aufgrund von Daten aus Bildgebung und Elektrophysiologie verschiedener Studien, dass pathologische Signalmuster durch die THS reduziert werden, indem eine Resonanz im Bereich der Stimulationsfrequenz die neuronale Feuerungsrate reguliert (McIntyre and Hahn 2010). In einer Studie von Ross et al. wurde beobachtet, dass eine hochfrequente THS im Bereich des zentralen Kerns der Amygdala mit einem verringerten Antrieb zur Nahrungsaufnahme einhergeht. Die Autoren führen den Effekt auf die Annahme zurück, dass die spontane neuronale Feuerungsrate durch die Stimulationsfrequenz überschrieben - d.h. gehemmt - wird (Ross et al. 2016).

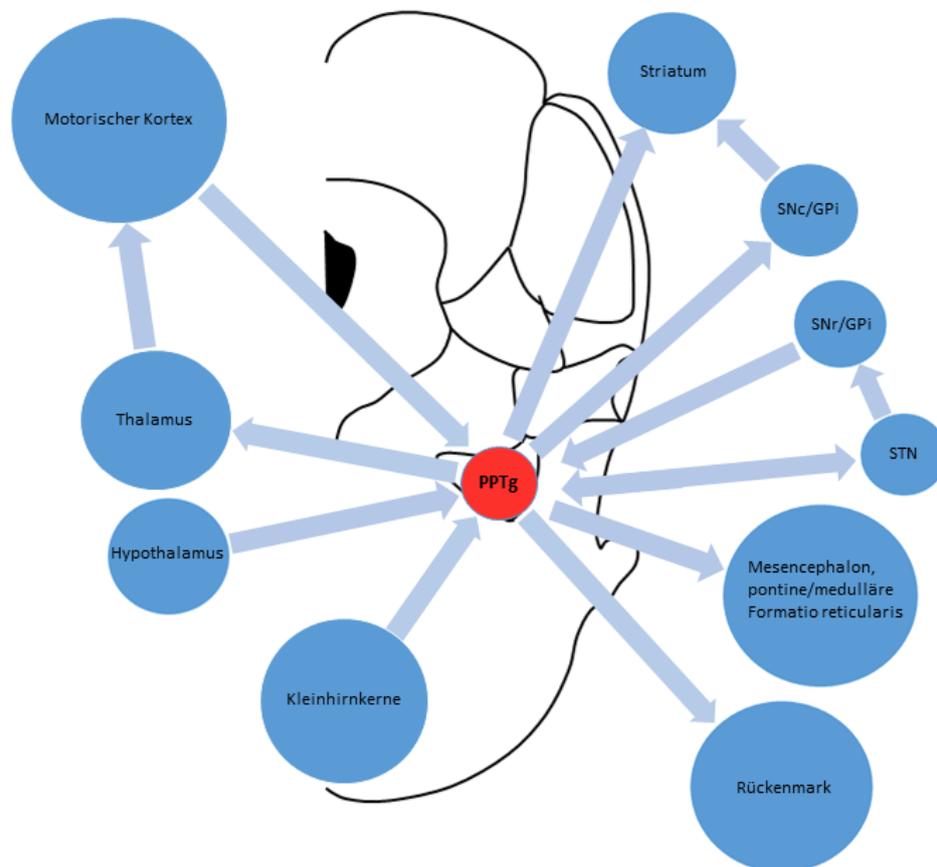
### Der pedunkulopontine tegmentale Nucleus

Shik et al. berichteten 1966 das erste Mal von einer Region im Mittelhirn, welche als Schaltstelle für die Motorik fungiert. Dieses Gebiet, bei dessen Stimulation eine stereotype Laufbewegung in dezerebrierten Katzen hervorgerufen wurde, bezeichneten die Autoren als mesenzephalische lokomotorische Region (MLR) und ordnete es dem Bereich des cuneiformen Nucleus (CNF) sowie dem pedunkulopontinen tegmentalen Nucleus (PPTg) zu (Shik, Severin, and Orlovskii 1966). In weiteren Arbeiten konnte bestätigt werden, dass ein Zentrum im Mittelhirn bei Wirbeltieren vorhanden sein muss, welches Bewegungen initiiert und kontrolliert. Dabei induziert diese Region keine Bewegungen, sondern ist vielmehr bei der Durchführung verschiedenster Arten von Bewegung verantwortlich (Shik, Severin, and Orlovskii 1966; Cabelguen, Bourcier-Lucas, and Dubuc 2003). Durch die Stimulation der MLR bei Ratten konnte von Skinner et al. gezeigt werden, dass die Laufgeschwindigkeit der Tiere mit Steigerung der verwendeten Stromstärke anstieg (Skinner and Garcia-Rill 1984). Bei Versuchen mit dezerebrierten Vögeln wurde die pontomedulläre Formatio reticularis stimuliert, welche Projektionen aus der MLR enthält (Steeves, Sholomenko,

and Webster 1987). Durch die Stimulation konnte man mit zunehmender Stromstärke zuerst Lauf- und dann Flugbewegungen induzieren. Auch in Salamandern wurde die MLR stimuliert. Dabei zeigte sich, dass man mit einer niedrigen Stromstärke Laufen induzieren konnte, während mit höheren Stromstärken Schwimmbewegungen verursacht wurden (Cabelguen, Bourcier-Lucas, and Dubuc 2003). Welche Bahnen durch die Stimulation im Bereich der MLR erreicht werden können, beschreiben Bachmann et al. in ihrer Studie, bei der Ratten eine Läsion im Rückenmark erhielten und anschließend mittels tiefer Hirnstimulation im Bereich der MLR behandelt wurden (Bachmann et al. 2013). Neben einer Verbindung der MLR zum lumbalen Rückenmark über reticulospinale Bahnen bestehen außerdem Verbindungen zu Kerngebieten in der Medulla oblongata. Bachmann et al. konnten in den Ratten mit spinaler Läsion ein Laufen und Schwimmen durch die tiefe Hirnstimulation wiederherstellen.

Die genaue Ausdehnung und Lokalisation der MLR wird immer noch diskutiert. Ältere Arbeiten gehen davon aus, dass die MLR anatomisch aus CNF sowie PPTg bestehen (Shik, Severin, and Orlovskiĭ 1966). Dies wird teilweise auch durch neuere Studien vermutet, wobei je nach Arbeit noch weitere Kernbereiche des Mittelhirns der MLR als zugehörig beschrieben werden (Jordan 1998; Bachmann et al. 2013; Roseberry et al. 2016). Die Arbeitsgruppe um Roseberry führte eine elektrische Stimulation im Bereich des Mittelhirns an Mäusen durch, um die Lage der MLR anhand einer induzierbaren Lokomotion zu bestätigen. Dabei konnten sie eine Laufbewegung der Tiere bei Stimulation im Bereich des CNF, des PPTg sowie des mesenzephalen retikulären Nucleus (MRN) beobachten (Roseberry et al. 2016). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit einer früheren Arbeit, in welcher aufgrund der Datenlage vermutet wurde, dass der PPTg durch indirekte Verbindungen zum Motorkortex und den Basalganglien eine wichtige Rolle für die posturale Kontrolle während der Lokomotion hat und der MLR weitestgehend entspricht (Garcia-Rill 1986). Die Vorstellung, dass der PPTg ein Bestandteil der MLR sein könnte, wird auch von Alderson et al. mit den Ergebnissen einer Studie von 2008 unterstützt. Diese ergab den Nachweis, dass die Läsion des anterioren Anteils des PPTg bei Ratten mit einer deutlich reduzierten Aktivität in verschiedenen Verhaltenstests einherging (Alderson, Latimer,

and Winn 2008). Dies scheint insofern plausibel, wenn man die Verbindungen des PPTg zu anderen Zentren nochmal genauer betrachtet (siehe Abbildung 1). In ihrer Arbeit von 2016 stellen Gut und Winn dar, dass der PPTg neben seinen Verbindungen zu den Basalganglien auch Bahnen zu pontomedullären, cerebellaren sowie spinalen und autonomen Kontrollzentren projiziert (Gut and Winn 2016). Insgesamt erscheint der PPTg eine Relaisstation im Mittelhirn zu sein, welche die Motorik effektiv beeinflussen kann. Daher zeichnet sich der PPTg auch als vielversprechendes Ziel für eine THS ab, um eine positive Wirkung auf die motorischen Beschwerden nach einem Schlaganfall zu vermitteln.



**Abbildung 1: Verbindungen des PPTg**

Schematische Darstellung des PPTg im histologischen Schnittbild (Koronarebene) mit Illustration der neuronalen Verbindungen. Über den Thalamus unterhält der PPTg Bahnen, die zum Kortex ziehen. Daneben bestehen Verbindung zu den Basalganglien, ebenso wie zu dem Kleinhirn sowie zu mesenzephalen und pontinen Strukturen (Gut and Winn 2016). STN = Nucleus subthalamicus; SNc = Substantia nigra, pars compacta; SNr = Substantia nigra, pars reticularis; GPi = Globus pallidus internus.

## Fragestellung und Zielsetzung

Aufgrund der wenig effizienten Therapieoptionen bei Schlaganfall-bedingten motorischen Defiziten soll die bei anderen neurologischen Bewegungsstörungen bereits etablierte THS des PPTg in einem Schlaganfallmodell getestet werden. Die MLR als motorische Kernregion des Mittelhirns soll hierzu als Stimulationsziel genutzt und der Status des PPTg als Bestandteil der MLR hinsichtlich seiner Funktion geprüft werden. Die Hypothese lautet, dass eine kontinuierlich durchgeführte, hochfrequente THS des PPTg zu einer Verbesserung der von einer kortikalen Photothrombose verursachten Gangstörung führen könnte. Diese Hypothese soll an einem Tiermodell mit Ratten getestet werden.

## Material und Methoden

### Ethik- und Tierversuchsvotum

Alle Tierexperimente wurden von der Ethikkommission der Universität Würzburg sowie von der Regierung von Unterfranken genehmigt (AZ 55.2-2531.01-102/13).

### Tiere

Die Versuche wurden mit insgesamt 18 erwachsenen (6-8 Wochen alten), männlichen Wistar-Ratten (250-275g) durchgeführt (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Nach Ankunft der Tiere wurden diese für eine Woche zur Gewöhnung in einem Raum mit kontrollierter Temperatur ( $22\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) und einem 12 h Licht-/12 h Dunkel-Zyklus gehalten. Die Tiere hatten dabei freien Zugang zu Futter und Wasser.

### Induktion eines Schlaganfalls mittels Photothrombose

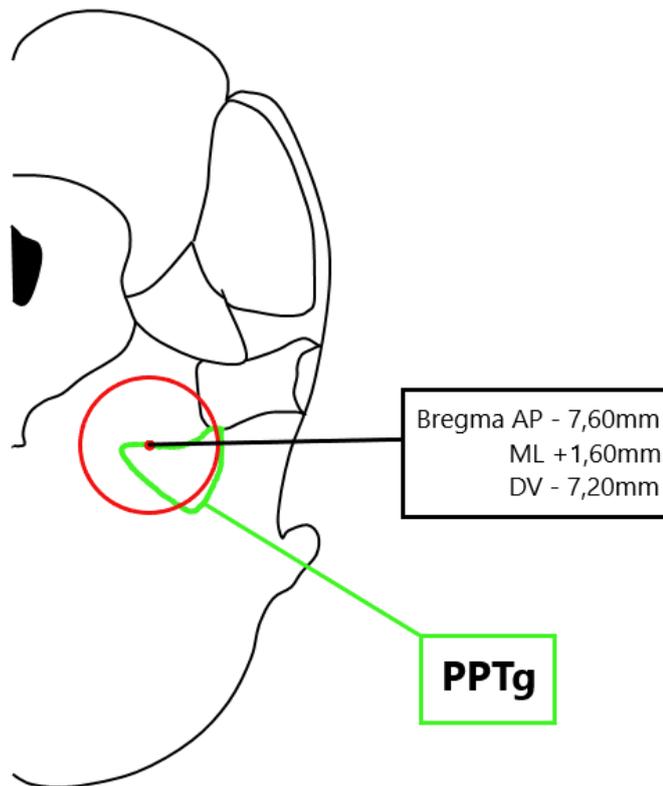
Bei allen Tieren wurde ein photothrombotischer Schlaganfall im Bereich des sensomotorischen Kortex der rechten Hemisphäre induziert. Während des Eingriffs

wurden die Tiere mit 2,5% Isofluran narkotisiert und zur Vorbeugung des Verlustes von Körperwärme mit isolierendem Material bedeckt.

Der Eingriff umfasste folgende Schritte (vgl. Fluri et al. 2017): Der Schädel des Tieres wurde freigelegt und eine Schablone aus Aluminium wurde auf diesem positioniert. Diese bestand aus einem rechteckigen Rahmen, der eine Fläche von 10 x 5mm freigab. Die Schablone wurde so auf dem Schädel positioniert, dass die kurzen Seiten des inneren Rahmens jeweils 5mm vor und 5mm hinter dem Bregma zu liegen kamen. Der Abstand zwischen Bregma und der langen Innenseite des Rahmens betrug 0,5mm (die gegenüberliegende Rahmeninnenseite war somit 5,5mm von der Mittellinie des Schädels entfernt). Diese Koordinaten korrespondieren mit dem sensomotorischen Kortex (Paxinos and Watson 2007). Ein beweglicher Lichtleiter einer Kaltlichtquelle wurde direkt über der Schablone fixiert. Nachdem Bengalrosa (0,5ml; Sigma, St. Louis, MO) in NaCl 0,9% (10mg/ml) intravenös appliziert worden war, wurde das Gehirn durch den intakten Schädel für 15 Minuten beleuchtet (KL1500LCD; Olympus, Tokyo, Japan). Direkt im Anschluss wurde die Implantation einer Mikroelektrode im PPTg-Kerngebiet durchgeführt.

### Implantation der Mikroelektrode

Das Vorgehen zur Implantation der Mikroelektrode orientiert sich wesentlich an dem Protokoll von Fluri et al. (Fluri et al. 2015). Zur Durchführung einer Hochfrequenz-Stimulation im PPTg-Kerngebiet wurden monopolare Mikroelektroden aus einer Platin/Iridium-Legierung verwendet (Katalog-# UE-PSEGSECN1M; FHC, Bowdoin, ME). Diese haben gegenüber Elektroden aus anderen Materialien den Vorteil, dass auch unter HFS über einen längeren Zeitraum (3 Tage) kein relevanter Gewebeschaden verursacht wird (Harnack et al. 2004). Die Elektroden wurden in den oberen Bereich des PPTg implantiert, gemäß den folgenden Koordinaten: 7,6mm posterior, 1,6mm lateral und 7,2mm ventral zum Bregma (vgl. Paxinos and Watson 2007, siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Zielposition zur Elektrodenimplantation:**

Schematische Darstellung eines koronaren Hirnschnitts einer Ratte in Ebene zu der Zielstruktur der Stimulation (Vgl. Paxinos and Watson 2007). Die anvisierte Lokalisation mit den angegebenen Koordinaten ist mit einem roten Punkt markiert, welcher direkt über dem PPTg (grün umrandet) zum Liegen kommt. Der rote Kreis repräsentiert den Radius von 700µm um die Elektrodenspitze herum, in welchem ein Effekt durch die Stimulation mit 50µA anzunehmen ist (Ranck 1975).

Das Bregma bezeichnet die Kreuzungsstelle der Sutura coronaris und der Sutura sagittalis. In einem Probenhalter eines stereotaktischen Instruments wurde eine Nadel fixiert und an der Spitze mit einem schwarzen Filzstift gefärbt. Die Nadelspitze wurde zunächst durch Drehen der anterior/posterior (AP)-, medial/lateral (ML)- und dorsal/ventral (DV)-Schrauben direkt über dem Bregma positioniert. Über einen Nonius-Messschieber wurden die exakten Koordinaten des Bregmas in der AP- und ML-Ebene abgelesen. Zum Auffinden der Implantationskoordinaten wurden 7,6mm von dem Wert der AP-Angabe und 1,6mm vom Wert der ML-Angabe abgezogen. Die errechneten Werte wurden anhand der AP- und ML-Schrauben eingestellt, sodass die

Nadel im Zielbereich positioniert wurde. Durch Drehen der DV-Schraube wurde die Nadel leicht mit dem Schädel in Berührung gebracht, sodass die schwarze Farbe dort eine Markierung hinterließ. Daraufhin wurde der Zahnbohrer im Probenhalter des stereotaktischen Instruments fixiert und über der markierten Stelle positioniert. Unter Sicht durch ein Mikroskop wurde ein Loch (Durchmesser ca. 1mm) durch den Schädelknochen bis auf die Dura mater gebohrt. Da die Dura mater kräftig genug ist, um die Mikroelektrode während der Implantation zu beschädigen, wurde diese mit einer Mikropräparierpinzette im Bereich der Schädelbohrung entfernt, ohne das darunterliegende Hirngewebe zu beschädigen. Für die Fixierung der Elektrode wurden vorbereitend fünf weitere Vertiefungen in den Schädelknochen gebohrt, ohne die Dura mater dabei zu eröffnen. Davon wurde eine Vertiefung jeweils rechts und links der Sutura sagittalis im Os frontale gebohrt. Eine Vertiefung wurde in den der Implantationsstelle gegenüberliegenden Teil des Os parietale sowie zwei weitere im Os interparietale gebohrt. Anschließend wurden fünf Schrauben aus rostfreiem Stahl (M1.6; Länge, 3mm; Hummer & Rieß, Nürnberg, Deutschland) mit 2-3 Umdrehungen in die Vertiefungen geschraubt, sodass diese stabil fixiert waren, ohne Druck auf das Hirngewebe auszuüben. Hiernach wurde die Mikroelektrode in den Probenhalter eingespannt. Mithilfe der AP- und ML-Schrauben wurde die Elektrode in die berechnete Position zur Implantation gebracht. Unter mikroskopischer Ansicht wurde die Elektrode durch Drehung an der DV-Schraube so weit herabgesenkt, bis die Spitze auf Höhe der Dura mater war bzw. bis sie Kontakt zur Gehirnoberfläche hatte. Diese Einstellung wurde als Null-Punkt auf der DV-Linie definiert. Zu diesem abgelesenen Wert der DV-Linie wurden 7,2mm addiert, um die tatsächliche Tiefe zu erhalten. Entsprechend der berechneten Tiefe wurde die Elektrode durch Drehen der DV-Schraube vorsichtig bis zu der Zielposition in das Hirngewebe abgesenkt. Im nächsten Schritt wurde die Elektrodenposition fixiert, indem eine kleine Menge künstlichen Zahnzements mit einem Spatel um die Elektrode sowie um die zwei vorderen und die zwei hinteren Schrauben herum verteilt wurde, sodass diese eingeschlossen wurden. Nach einer Wartezeit von ca. fünf Minuten war der Zement ausgehärtet. Ein individuell gefertigter Stecker (GT-Labortechnik, Arnstein, Deutschland) wurde auf die Elektrode

gesetzt und dessen Erdungskabel mit der frei gebliebenen Schraube im Os parietale verbunden. Anschließend wurde ein zweites Mal Zahnzement auf den Schädel aufgetragen, sodass die frei gebliebene Schraube und der untere Abschnitt des Steckers mit eingefasst waren. Bei dem Verteilen des Zahnzements wurde darauf geachtet, dass sich insgesamt eine abgerundete Oberfläche ohne Kanten und Ecken ergab, um das Verletzungspotential für das umliegende Gewebe zu reduzieren. Nach dem erneuten Aushärten ergab sich eine feste Kappe, welche sowohl die Schrauben, als auch die Elektrode mit dem Stecker umfasste. Um die Wunde komplett zu verschließen, wurden die Schnittränder vor und hinter der Kappe per Einzelknopfnah adaptiert. Zuletzt konnte die Narkose beendet werden, woraufhin das Tier ca. fünf Minuten später aufwachte. Die Gesamtdauer des Eingriffs inklusive Photothrombose und Implantation umfasste ca. 120 Minuten.

Am Tag der Operation sowie in der postoperativen Phase bis zum Beginn der kontinuierlichen Stimulation (T0 – T3) wurden die Tiere täglich gewogen, um die Belastung durch die Operation und die Erholung zu überprüfen. Tiere, deren Allgemeinzustand sich im Rahmen des Versuchsprotokolls spontan verschlechterte, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Als Kriterien für einen reduzierten Gesundheitszustand wurde ein Gewichtsverlust von >20% des Körpergewichts im Vergleich zum Zustand vor Intervention, eine Vernachlässigung der Fellpflege und eine Verminderung der spontanen Aktivität im Käfig festgelegt.

## Elektrische Stimulation

Zur tiefen Hirnstimulation wurde ein Stimulus-Generator vom Typ STG 4002 (Multichannel Systems, Reutlingen, Deutschland) verwendet. Dazu wurden folgende Parameter gewählt: Frequenz = 130 Hz, Pulslänge = 60  $\mu$ s, Impulsform = monophasische Rechteckimpulse. Ab dem zweiten Tag nach dem Eingriff wurde die Reaktion der Tiere auf die tiefe Hirnstimulation getestet. Um die niedrigste Stromstärke zu ermitteln, welche noch eine lokomotorische Reaktion auslöst, wurde initial eine Stromstärke von 20  $\mu$ A gewählt und diese in Schritten von 10  $\mu$ A bis zur

maximalen Ausprägung einer lokomotorischen Reaktion gesteigert. Durch wiederholtes An- und Abschalten des Stimulus-Generators konnte die Reproduzierbarkeit der beobachteten Reaktionen nachgewiesen werden. Die Reaktion der Tiere wurde protokolliert und unter Verwendung einer Videokamera (Sony Corporation, Model No. HDR-CX570E, China) festgehalten. Die so ermittelte niedrigste Stromstärke wurde für die kontinuierliche Stimulation verwendet und lag bei den stimulierten Tieren am 3. postoperativen Tag bei 55  $\mu\text{A}$  ( $\pm 5 \mu\text{A}$ ) (Siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Stromstärkenschwellen zur Induktion von motorischen Reaktionen**

Ermittelte Stromstärken vom 3. postoperativen Tag, ab welcher eine motorische Reaktion bei den Tieren induzierbar war. Diese Stromstärken wurden in der Fallgruppe zur kontinuierlichen Stimulation verwendet.

Tiere	Stromstärke ( $\mu\text{A}$ ) bei erster motorischer Reaktion
<b>Tier 1</b>	<b>50</b>
<b>Tier 2</b>	<b>60</b>
<b>Tier 3</b>	<b>50</b>
<b>Tier 4</b>	<b>60</b>
<b>Tier 5</b>	<b>60</b>
<b>Tier 6</b>	<b>55</b>
<b>Tier 7</b>	<b>50</b>
<b>Tier 8</b>	<b>50</b>

Zur Durchführung der permanenten Stimulation wurden 18 Ratten über den Zeitraum von zehn Tagen einzeln in einem Käfig gehalten. Eine Vorrichtung mit einem flexiblen Ringschleifkontakt am Deckel eines jeden dieser Käfige gewährleistete eine permanente Verbindung via Kabel zu dem Stecker auf dem Schädel eines jeden Tieres. Hierrüber konnten 9 Tiere durchgehend stimuliert werden, während die anderen 9 Tiere als Kontrollen ohne Stromzufuhr an dem Kabel angeschlossen waren. Für die Tiere war mithilfe einer doppelten Käfighöhe und einer ausreichenden Länge des Kabels volle Mobilität innerhalb des Käfigs gewährleistet. Die kontinuierliche Stimulation wurde am dritten Tag nach der Operation begonnen (T3) und nach zehn Tagen beendet (T13, siehe Abbildung 3). Zur Auswahl einer geeigneten Stimulationsdauer unter solchen Bedingungen gab es bei Beginn des Experiments keine klare Datenlage (Machado and Baker 2012). In dieser Arbeit wurde sich für eine Stimulationsdauer von 10 Tagen unter der Annahme, dass ein positiver Effekt der kontinuierlichen Stimulation hierunter zum Tragen kommt. Die Zuteilung der Tiere zu einer jeweiligen Gruppe erfolgte zufällig.

## Versuchsübersicht



Abbildung 3: Versuchsübersicht

## Verhaltenstests

### Beam-Walking-Test

Bei dem Beam-Walking-Test mussten die Ratten einen schmalen Holzbalken überqueren. Im Detail bestand der Testapparat aus einem Holzbalken mit einer Länge von 90cm und einer Breite von 9mm. Dieser wurde auf zwei Standardkäfige gelegt und befand sich somit in einer Höhe von 23cm über dem Untergrund. Auf der einen Seite wurde der Balken auf einen offenen Käfig gelegt, was gleichzeitig das Ziel der Strecke darstellte, während er am anderen Ende auf einem umgedrehten Käfig lag. Beim Beam-Walking-Test wurden die einzelnen Überquerungen anhand einer Bewertungsskala mit 7 Punkten bewertet, dem sogenannten „Beam-Walking-Score“ (Abo et al. 2006) (siehe Tabelle 2). 7 Punkte: Das Tier überquert den Balken mit maximal zweimaligem Abrutschen des betroffenen Hinterlaufes; 6 Punkte: Das Tier überquert den Balken und benutzt den betroffenen Hinterlauf für mehr als 50% der Testdistanz; 5 Punkte: Das Tier überquert den Balken und benutzt den betroffenen Hinterlauf für weniger als 50% der Testdistanz; 4 Punkte: Das Tier überquert den Balken und kann den betroffenen Hinterlauf auf den Balken setzen, diesen aber nicht mit Gewicht belasten; 3 Punkte: Das Tier überquert den Balken ohne den betroffenen Hinterlauf zu belasten und ist nicht in der Lage, diesen auf den Balken zu setzen; 2 Punkte: Das Tier kann den Balken innerhalb von 90 Sekunden nicht überqueren, ist aber in der Lage die Balance auf dem Balken zu halten; 1 Punkt: Das Tier fällt von dem Balken. Pro Testtermin wurde aus drei gewerteten Überquerungen der Durchschnittswert errechnet und zum Vergleich der zu verschiedenen Zeitpunkten erhobenen Befunde verwendet.

**Tabelle 2: Beam-Walking-Score**

Punktesystem zur Einschätzung des motorischen Defizits nach unilateralem Schlaganfall bei Ratten anhand des Beam-Walking-Tests.

Punktzahl	Kriterien
7	Maximal zweimaliges Abrutschen mit dem betroffenen Hinterlauf
6	Betroffener Hinterlauf wird auf >50% der Testdistanz genutzt
5	Betroffener Hinterlauf wird auf <50% der Testdistanz genutzt
4	Betroffener Hinterlauf kann auf den Balken aufgesetzt, jedoch nicht belastet werden
3	Überquerung der Testdistanz ohne Nutzung des betroffenen Hinterlaufes, Aufsetzen des Hinterlaufes unmöglich
2	Überquerung der Testdistanz nicht möglich innerhalb von 90 Sek., Tier kann die Balance auf dem Balken halten
1	Das Tier fällt von dem Balken

#### Ladder-Rung-Walking-Test

Im Rahmen des Ladder-Rung-Walking-Tests mussten die Ratten einer horizontalen Sprossenleiter entlanglaufen. Die Leiter bestand aus dünnen Eisensprossen, welche durch kleine Löcher an der Basis zweier parallel zueinanderstehender transparenter Plexiglas-Wände eingesteckt waren. Die Leiter hatte eine Länge von 100cm und eine Breite von 8cm zwischen den Wänden. Die Sprossen hatten einen Durchmesser von 3mm. Der Abstand zwischen den Sprossen wurde zufällig gewählt und variierte

zwischen 1 und 3cm, um die Anforderung an das Koordinationsvermögen der Tiere zu steigern. Für alle Tests wurde dasselbe Muster verwendet. Die Leiter war in einer Höhe von 23cm über dem Untergrund auf Standardkäfigen positioniert. Am Start befand sich ein umgedrehter und am Ziel ein offener Käfig. Bei der Auswertung des Ladder-Rung-Walking-Tests wurden die einzelnen Schritte der linksseitigen Gliedmaßen, welche vom rechtsseitigen Schlaganfall betroffen sind, gezählt und hinsichtlich auftretender Fehler beurteilt. Diese wurden dann anhand des „Foot-Fault-Scores“ mit Fehlerpunkten bewertet. Dabei wurde der Bewegungsablauf der Pfote bei der Fortbewegung auf den Leitersprossen in den Sequenzen zerlegt und bewertet (Metz and Whishaw 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde ein fehlerhaftes Aufsetzen respektive Nicht-Aufsetzen der Vorder- bzw. Hinterpfote auf der Sprosse wie folgt bewertet: Ein sogenannter „Slight slip“ sowie ein „Deep slip“ erhielten je einen Fehlerpunkt, während ein „Total miss“ mit zwei Fehlerpunkten bewertet wurde. Bei dem „Slight slip“ handelt es sich um das Abrutschen einer Pfote von der Sprosse ohne Störung des Laufrhythmus. Bei dem „Deep slip“ rutscht das Tier mit einer Pfote von der Leitersprosse, welche das Tier mit Gewicht belastet hat, sodass die Körperachse durch das Abrutschen absinkt und der Laufrhythmus unterbrochen wird. Ein „Total miss“ ist durch das komplette Verfehlen der Sprosse bei dem Versuch, eine Pfote auf dieser zu platzieren, gekennzeichnet. Auch dabei wird Gewicht auf die betreffende Pfote verlagert, sodass es zu einem Absinken der Körperachse und Unterbrechung des Laufrhythmus kommt. Bei der Ermittlung der Gesamtzahl an Schritten, welche das Tier zur Überquerung der Leiter benötigt, werden nur Schritte innerhalb des Laufrhythmus gewertet. Ausgeschlossen davon sind der erste und der letzte Schrittzzyklus, die bei der Überquerung der Leiter ausgeführt werden. Ebenso werden die Schrittzzyklen vor und nach einem Anhalten des Tieres nicht gewertet. Wenn das Tier einen Schritt macht, der mit Fehlerpunkten bewertet wird, wird der darauffolgende Schrittzzyklus auch aus der Wertung ausgeschlossen. Die in drei Überquerungen gezählten Fehlerpunkte pro Tier wurden im Verhältnis zu der insgesamt gewerteten Schrittzahl gesetzt und in dieser Form zur Auswertung verwendet.

## Zeitlicher Ablauf

Um Veränderungen des Gangbildes (und allgemein der Fortbewegung) im Laufe des Experiments feststellen zu können, wurden die Verhaltenstests an unterschiedlichen Tagen durchgeführt (siehe. Abbildung 3). Zur Vorbereitung der Tests wurden die Tiere nach Abschluss der Akklimatisierung für sieben Tage durch tägliches Training auf der Sprossenleiter bzw. auf dem Holzbalken an die Bedingungen gewöhnt. Das Training bestand aus fünfmaligem Überqueren der Leiter bzw. des Balkens pro Tier und pro Tag. Am siebten Tag wurde der Verhaltenstest videographisch aufgenommen, um das Gangbild beim gesunden Tier vor der Operation zu dokumentieren (Zeitpunkt T-1, siehe Abbildung 3). Hierzu wurden pro Tier je drei Überquerungen der Leiter und des Balkens mit einer digitalen HD Videokamera (Sony Corporation, Model No. HDR-CX570E, China) aufgenommen und später ausgewertet. Im Anschluss an die Operation wurde ein Tag Pause zur Erholung der Tiere von dem Eingriff gewährleistet. Am zweiten Tag nach der Operation (T2, siehe Abbildung 3) wurden die Verhaltenstests wie oben beschrieben wiederholt, um den Einfluss der induzierten Photothrombose auf die Gehfähigkeit zu überprüfen. Zur Nachvollziehbarkeit, inwiefern sich die motorischen Fähigkeiten der Tiere verändern, wurden die Verhaltenstests unmittelbar im Anschluss an die Beendigung der permanenten Stimulation an Tag 13 erneut wiederholt (siehe Abbildung 3).

## Histologische Auswertung

Nach Absolvierung der letzten Verhaltenstesteinheit wurden die Tiere zur Entnahme des Hirngewebes getötet. Die Tiere wurden mittels Kohlenstoffdioxid in eine tiefe Narkose versetzt. Daraufhin wurde eine transkardiale Ganzkörperperfusion mit einer Phosphatpufferlösung (pH = 7,4) durchgeführt, um das Gewebe schonend von Blut frei zu spülen. In einem nächsten Schritt wurde die Perfusion mit Paraformaldehyd (PFA 4%) zur Fixierung des Gewebes wiederholt (Gage, Kipke, and Shain 2012). Für diese Methode wurde eine Laborpumpe vom Typ Watson-Marlow 323 (Pumpenkopf 501RL, Rommerskirchen, Deutschland) genutzt. Unmittelbar im Anschluss wurde jedem Tier das Neurokranium dorsal vom Foramen magnum ausgehend eröffnet und das Gehirn

entnommen. Für die folgende Einbettung in Paraffin wurde das Gehirn in koronare Segmente mit einer Dicke von 4mm geschnitten. Mit einem Mikrotom (Leica SM 2000R, Wetzlar, Deutschland) wiederum wurden aus den Paraffinblöcken 10µm dicke Schnitte angefertigt. Um die Infarktausdehnung zu messen wurde jeder zehnte Schnitt mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt und mittels eines Scanners (Epson Perfection V500 Photo, Epson, Deutschland) digitalisiert. Unter Verwendung der ImageJ Analysis Software 1.52e (National Institutes of Health, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) wurde auf jedem Bild die Größe der Hemisphären sowie die Ausdehnung des Infarkts manuell ausgemessen. Diese Werte wurden summiert und entsprechend der Schnitt-Intervalle multipliziert. Die endgültige Infarktgröße wurde als prozentualer Anteil an der Hemisphäre angegeben. Um den Überlappungsgrad der Infarktausdehnung der einzelnen Tiere zu visualisieren, wurde die Infarktfläche bestimmter Hirnschnitte (Hirnschnitte 0, 1, 2, 3 und 4 mm anterior sowie die Hirschnitte 1, 2, 3 und 4 mm posterior vom Bregma) in die entsprechenden Schemata von koronaren Hirnschnitten übertragen (Abbildung 4A, B).

Die Schnitte, welche den Elektrodenstichkanal aufwiesen, wurden ebenfalls mit HE gefärbt. Auf den HE-gefärbten Schnitten konnte man die Läsion, welche die Elektrode am Gewebe verursacht hatte, gut als senkrecht verlaufende Linie erkennen (siehe Abbildung 5A). Die tiefste Stelle dieser Läsion, welche man unter Berücksichtigung aller Schnitte ausmachen konnte, wurde als Ort der Elektrodenspitze angenommen. Hierdurch wurde für jedes Tier die tatsächliche Lage der Elektrodenspitze im Mesencephalon nachgewiesen (siehe Abbildung 5B, C).

Die Wirkung der elektrischen Stimulation wurde überprüft, indem die Expression von c-Fos in Hirnzellen um den tiefsten Punkt des Stichkanals (= Lage der Elektrodenspitze) visualisiert wurde. C-Fos ist ein Protoonkogen, welches mit langfristig adaptiven Prozessen im zentralen Nervensystem korreliert ist (Pennypacker, Hong, and McMillian 1995). Da dessen Genprodukt 60 Minuten nach einem adäquaten Stimulus einen maximalen Spiegel erreicht (Morgan et al. 1987), lässt sich durch dessen Nachweis ein unmittelbarer Effekt der elektrischen Stimulation auf das umliegende Hirngewebe gut nachvollziehen. Daneben wurden cholinerge Neuronen gesucht, welche dem PPTg

zuzuordnen sind und hierdurch die Lage im Mesencephalon bestätigen. Die Zellkerne wurden mit dem DNA-markierenden Stoff 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI; Sigma-Aldrich, St Louis, MO; catalogue # D9542) angefärbt. Für diesen repräsentativen Nachweis wurde eine stimulierte Ratte direkt nach einem separaten Stimulationsblock von 90 Minuten Dauer euthanasiert. Dasselbe Prozedere wurde mit einer unstimulierten Ratte als Kontrolle durchgeführt. Das wie oben beschrieben entnommene Gehirn wurde in Paraffin eingebettet und ebenfalls zu Schnitten (10µm dick) verarbeitet. Die histologischen Präparate, auf welchen die durch die Elektrode bedingte Läsion im PPTg sichtbar war, wurden für eine Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung genutzt unter Verwendung eines *RNAscope*<sup>®</sup> Multiplex Fluorescent v2 Assays gemäß den Angaben des Herstellers ((Advanced Cell Diagnostics, Mailand, Italien; Katalog # 323100) (durchgeführt von Dr. rer. nat. Michael Schuhmann). Die Messsonden mit c-Fos als Zielstruktur (*RNAscope*<sup>®</sup> Sonde Rn-Fos, Katalog # 403591) sowie die für ChAT (*RNAscope*<sup>®</sup> Sonde Rn-Chat-C2, Katalog # 430111-C2) wurden von „Advanced Cell Diagnostics“ produziert. Nach erfolgter Amplifikation und Markierung wurden die Präparate noch mit DAPI (Sigma-Aldrich, St Louis, MO; Katalog # D9542) gegengefärbt. Das Ergebnis wurde mit einem Leica MDi8 Mikroskop (Vergrößerung x40) aufgenommen.

## Statistische Analyse

Die Infarkt volumina der stimulierten und unstimulierten Tiere wurden anhand des T-Tests für unabhängige Gruppen sowie mithilfe des Levene-Tests verglichen (n = 8 vs. 6). Für die statistische Auswertung der Verhaltenstests wurden bei jedem Tier für den jeweiligen Testtermin der Mittelwert aus den Daten der drei ausgewerteten Testläufe je Verhaltenstest errechnet. Anhand dieser Mittelwerte konnten die Tiere untereinander verglichen werden. Zur Ermittlung der Ausgangssituation wurde mit den Daten des ersten Testtermins (T-1) aus Beam-Walking-Test und Ladder-Rung-Walking-Test die Fallgruppe mit der Kontrollgruppe im T-Test für unabhängige Gruppen sowie mit dem Levene-Test verglichen (n = 8 vs. 6). Um eine Veränderung der motorischen Defizite festzustellen, die durch die Induktion der Photothrombose zustande kam,

wurden die Werte der Tiere aus dem Test vor der Operation (T-1) mit denen des Tests nach der Operation (T2) gegenübergestellt. Zur Analyse wurde der T-Test für gepaarte Stichproben je einmal mit den Daten des Beam-Walking-Tests sowie mit den Daten aus dem Ladder-Rung-Walking-Test durchgeführt (n = 14). Um feststellen zu können, ob die Tiere der Fall- und Kontrollgruppe im ähnlichen Ausmaß von der Photothrombose betroffen waren, wurde mit einem direkten Vergleich der Beam-Walking-Score-Werte bzw. Foot-Fall-Score-Werte vom zweiten Testtag (T2) geprüft. Hierbei wurden die Daten der Fallgruppe, beziehungsweise der stimulierten Tiere, mit denen der Kontrollgruppe, d.h. den nicht-stimulierten Tieren, unter Verwendung des T-Tests für unabhängige Gruppen mit dem Levene-Test verglichen (n = 8 vs. 6). Der Einfluss, den die kontinuierliche Stimulation auf die motorischen Defizite der Tiere hat, wurde auf gleiche Weise mit den Daten des dritten Testtermins (T13) untersucht. Für alle statistischen Berechnungen wurde das Statistikprogramm „IBM SPSS Statistics Subscription 2020“ genutzt. Die Werte werden jeweils mit dem dazugehörigen Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

## Ergebnisse

### Verhalten der Tiere im Versuchsprotokoll

Im Verlauf des Versuchs mussten ein stimuliertes sowie drei nicht-stimulierte Tiere aus dem Experiment ausgeschlossen werden, da sie eine spontane Verschlechterung des Gesundheitszustandes aufwiesen (Vernachlässigung der Fellpflege, verminderte Nahrungsaufnahme, eingeschränktes Spontanverhalten).

Unmittelbar nach der operativen Intervention konnte bei allen Tieren ein gewisses Maß an Abgeschlagenheit beobachtet werden. Dies zeigte sich in einer Reduktion des spontanen Verhaltens, wie dem Erkunden der Umgebung und der Fellpflege. Dazu kam in der Regel ein geringer Verlust an Körpergewicht (<15% des Körpergewichts vor der Intervention; siehe Tabelle 3), wobei bei 13 von 14 Tieren noch vor Beginn der kontinuierlichen Stimulation eine erneute Gewichtszunahme gemessen werden

konnte. 48 Stunden nach der Intervention konnte bei allen Tieren jedoch eine Erholung und Stabilisierung des Allgemeinzustandes festgestellt werden. Trotz der Veränderungen, die man in den Verhaltenstests erkennen konnte, waren fortan keine bleibenden Einschränkungen bei den Tieren bezüglich der Beweglichkeit innerhalb des Käfigs, noch der Körperpflege oder der Nahrungsaufnahme zu beobachten. Daraus lässt sich ableiten, dass 1. die Implantation einer Elektrode im Mittelhirn keinen sichtbaren Effekt auf das spontane Verhalten der Tiere hat und 2. die photothrombotisch bedingten Defizite lediglich unter erschwerten Bedingungen, wie in einem Verhaltenstest, erkennbar sind.

**Tabelle 3: Postoperative Gewichtskontrolle**

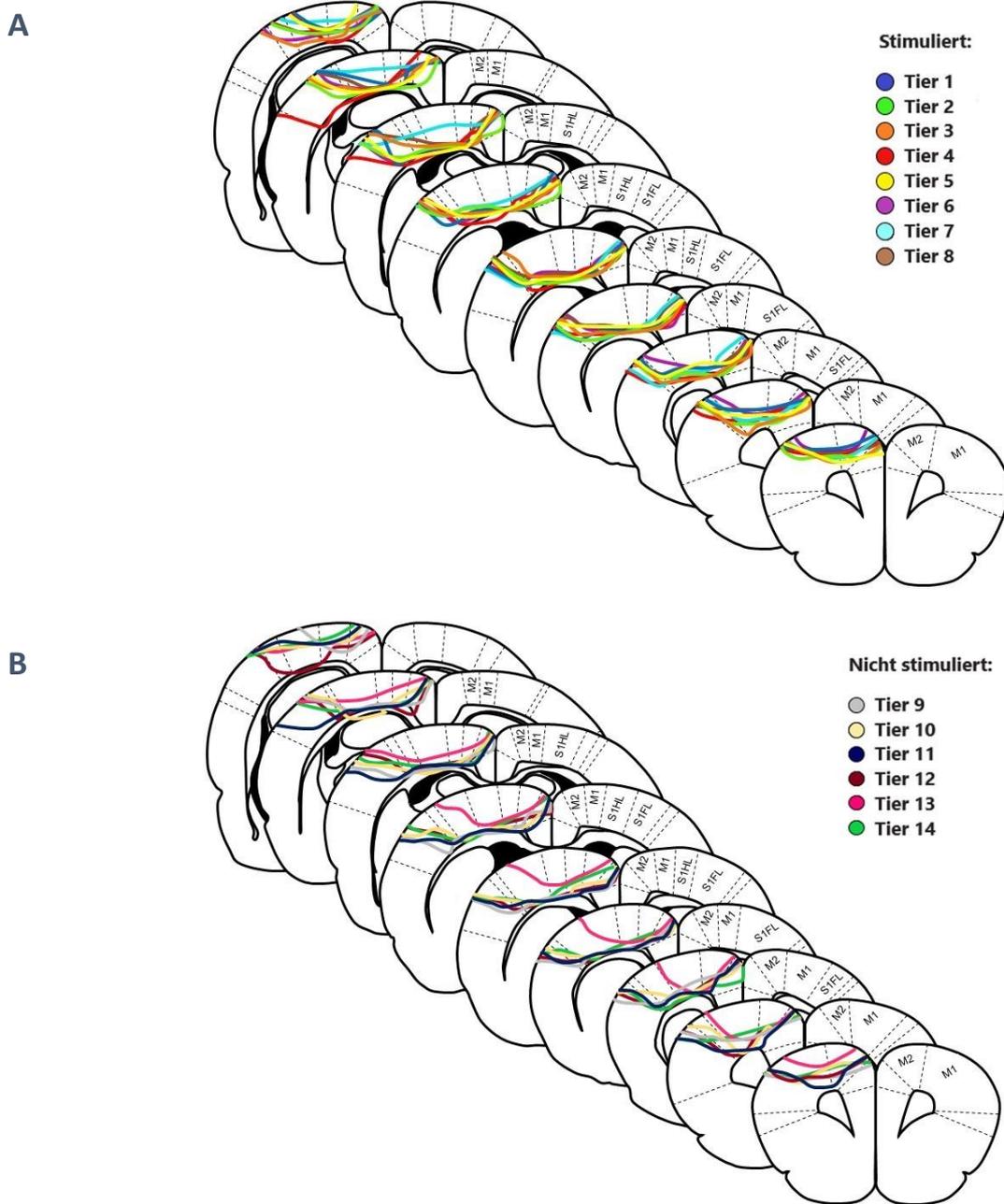
Aufzeichnungen des Körpergewichts der Versuchstiere beginnend am Tag des operativen Eingriffs bis zum Start der kontinuierlichen Stimulation (T0 – T3). Angabe des Gewichts in Gramm sowie die Differenz als prozentualer Anteil zum Gewicht an T0.

<b>Stimuliert</b>								
	<b>Tier 1</b>		<b>Tier 2</b>		<b>Tier 3</b>		<b>Tier 4</b>	
<b>Postop. Tag</b>	KG (g)	<b>KG Δ (%)</b>						
T0	312		279		302		286	
T1	290	-7,05	255	-8,60	278	-7,95	263	-8,04
T2	294	-5,77	259	-7,17	274	-9,27	263	-8,04
T3	296	-5,13	264	-5,38	280	-7,28	268	-6,29
	<b>Tier 5</b>		<b>Tier 6</b>		<b>Tier 7</b>		<b>Tier 8</b>	
<b>Postop. Tag</b>	KG (g)	<b>KG Δ (%)</b>						
T0	300		272		286		276	
T1	292	-2,67	256	-5,88	274	-4,20	269	-2,54
T2	295	-1,67	258	-5,15	286	0,00	277	0,36
T3	299	-0,33	259	-4,78	292	2,10	279	1,09

<b>Nicht-stimuliert</b>								
	<b>Tier 9</b>		<b>Tier 10</b>		<b>Tier 11</b>		<b>Tier 12</b>	
<b>Postop. Tag</b>	<b>KG (g)</b>	<b>KG Δ (%)</b>						
T0	303		333		325		274	
T1	277	-8,58	305	-8,41	304	-6,46	245	-10,58
T2	260	-14,19	314	-5,71	303	-6,77	233	-14,96
T3	262	-13,53	315	-5,41	314	-3,38	254	-7,30
	<b>Tier 13</b>		<b>Tier 14</b>					
<b>Postop. Tag</b>	<b>KG (g)</b>	<b>KG Δ (%)</b>	<b>KG (g)</b>	<b>KG Δ (%)</b>				
T0	291		265					
T1	272	-6,53	269	1,51				
T2	277	-4,81	265	0,00				
T3	285	-2,06	264	-0,38				

## Phot thrombose

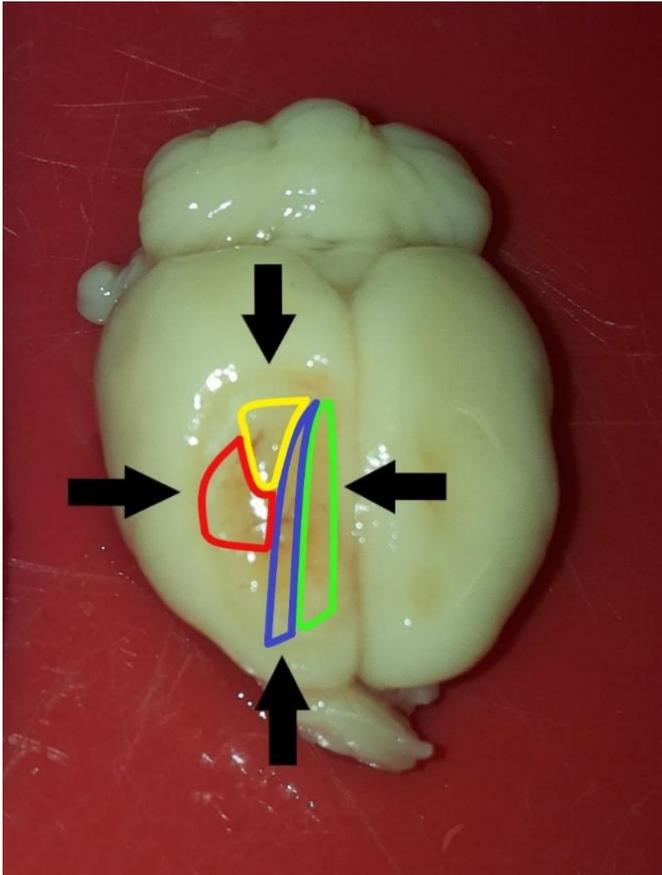
Alle Tiere wiesen sowohl makroskopisch (siehe Abbildung 4C), als auch in der histologischen Aufarbeitung eine gut sichtbare phot thrombotische Läsion des rechten sensomotorischen Kortex auf (siehe Abbildung 4A, B). Eine weitere Analyse der Läsionsvolumina ergab zudem, dass die stimulierten Tiere eine ähnliche Infarktgröße aufwiesen wie die nicht-stimulierten Tiere (stimuliert vs. nicht-stimuliert; n = 8 vs. 6:  $10,77 \pm 1,38\%$  vs.  $11,09 \pm 1,11\%$ ;  $p=0,43$ ; siehe Abbildung 4D).



**Abbildung 4 Betrachtung der Photothrombose**

**4A, 4B: Mikroskopische Darstellung** des Rattengehirns. Für jedes Tier wurden die Infarktausdehnungen der gefärbten Schnitte (Hirnschnitte 0, 1, 2, 3 und 4 mm anterior sowie 1, 2, 3 und 4 mm posterior vom Bregma) in entsprechende Schemata von koronaren Hirnschnitten zusammengetragen. Eine geteilte Darstellung erfolgte entsprechend der Zuteilung von Fall- und Kontrollgruppe: Abb. **4A** = Stimulierte Tiere; Abb. **4B** = Nicht stimulierte Tiere.

C



Sekundär motorischer Kortex

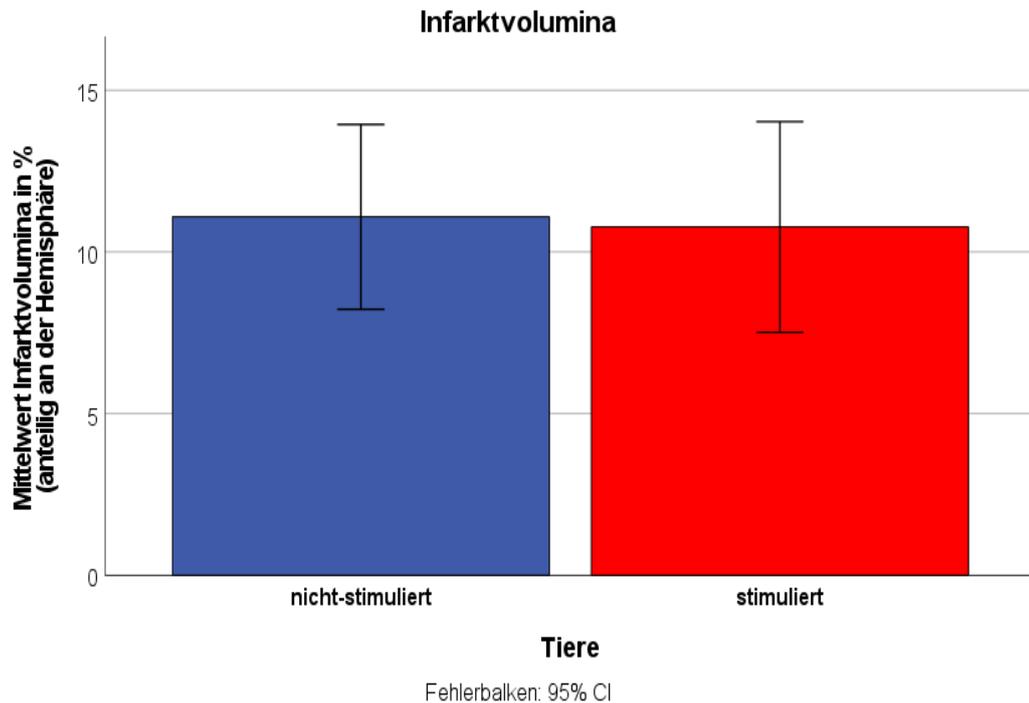
Primär motorischer Kortex

Primär somatosensorischer Kortex,  
Vorderlauf

Primär somatosensorischer Kortex,  
Hinterlauf

**4C:** Makroskopische Ansicht auf ein entnommenes Rattengehirn. Die schwarzen Pfeile weisen auf das Ausmaß des photothrombotisch induzierten Infarktes hin. Zur Orientierung wurden die Projektionen folgender Areale farblich umzeichnet: Grün = Sekundär motorischer Kortex; Blau = Primär motorischer Kortex; Rot = Primär somatosensorischer Kortex, Vorderlauf; Gelb = Primär somatosensorischer Kortex, Hinterlauf (vgl. Paxinos and Watson 2007)

D



**4D:** Graphische Darstellung der mittleren Infarkt volumina von Fall- und Kontrollgruppe (stimuliert vs. nicht-stimuliert; n = 8 vs. 6: 10,77±1,38% vs. 11,09±1,11%; p=0,43)

## Elektrische Stimulation

### Histologische Untersuchungen

Die Lage der Elektrodenspitze im Mittelhirn konnte bei allen Tieren nachgewiesen werden. Insgesamt ergab sich eine leichte Variabilität in verschiedene Richtungen vom Zielort aus, wobei Abweichungen nach ventral auf der DV-Linie bzw. nach unten im histologischen Bild im Vordergrund standen (siehe Abbildung 5B, C).

A

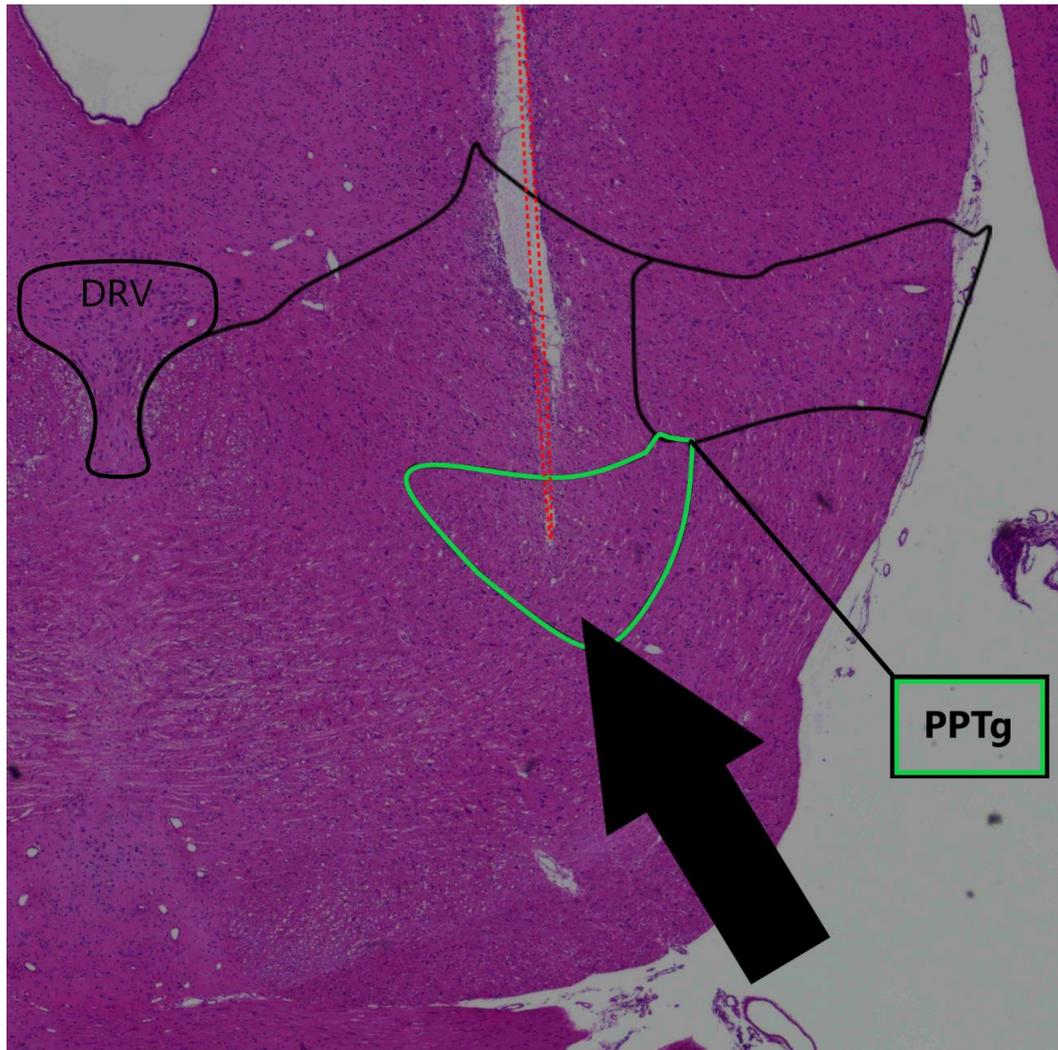
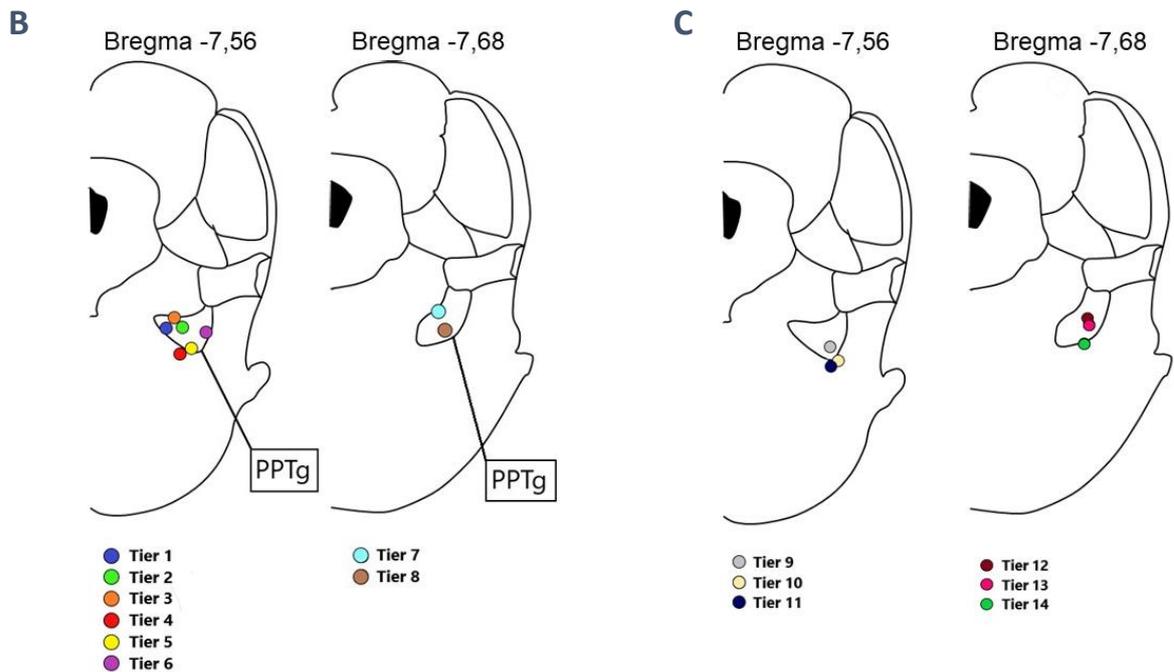


Abbildung 5: Lage der Elektrodenspitze

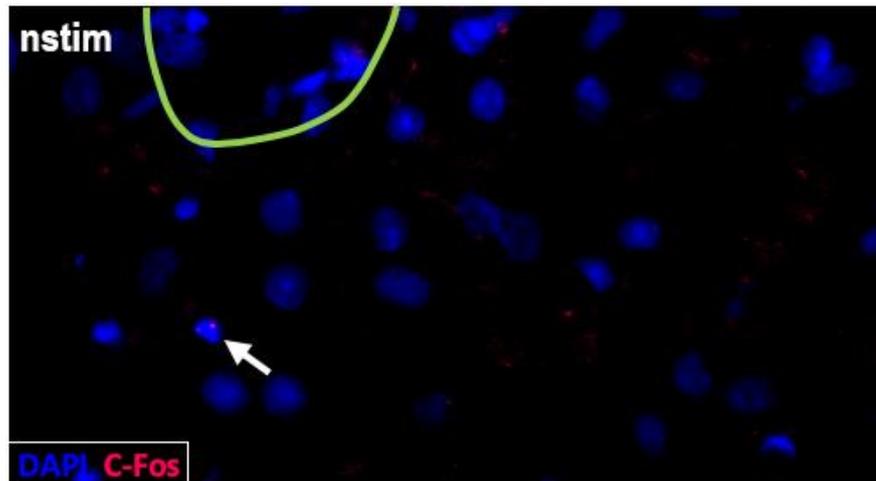
**5A:** Repräsentativer Hirnschnitt mit Hämatoxylin und Eosin-Färbung und 20facher Vergrößerung zur Darstellung der Elektrodenlage. Der schwarze Pfeil verweist auf den Bereich der Elektrodenimplantation. Die Lage der Elektrode wird durch die auf histologischer Ebene erkennbare Gewebeläsion nachvollzogen und ist mit einer gestrichelten roten Linie gekennzeichnet. Die Elektrodenspitze findet sich demnach im Kerngebiet des PPTg, welches grün umrandet ist. Zur Lagebestimmung des PPTg wurde ein Schema genutzt, welches sich an markanten histologischen Strukturen orientiert, wie zum einen der ventrale Anteil der dorsalen Raphe Nuclei (DRV) und zum anderen der laterale Rand des Mittelhirns (Vgl. Paxinos and Watson 2007).



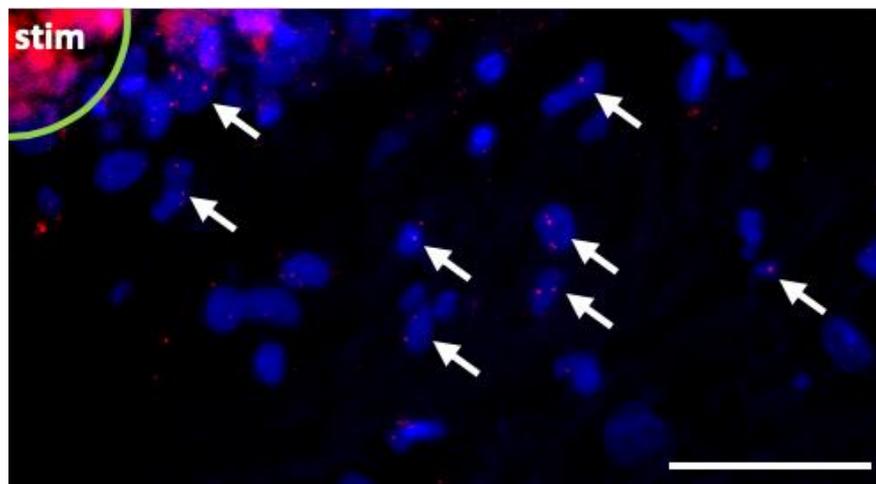
**5B,C:** Schematische Darstellung der Elektrodenpositionen im Mittelhirn. In Abbildung **5B** sind die gefundenen Lokalisationen bei den stimulierten Tieren zusammengefasst, während die Elektrodenpositionen bei den nicht stimulierten Tiere in **5C** gezeigt werden.

Nach Stimulation zeigte sich eine deutlich verstärkte Expression von c-Fos in unmittelbarer Nähe zur Elektrodenspitze verglichen mit dem Gewebe der weiteren Umgebung (siehe Abbildung 6B). Die Kontroll-Darstellung mit einem nicht-stimulierten Tier ergab, dass das perifokale Gewebe der Elektrodenspitze eine geringere c-Fos-Expression zeigte (siehe Abbildung 6A).

A



B



#### Abbildung 6: C-Fos-Expression

**6A, B:** Repräsentativer Hirnschnitt mit Farbmarkierung von C-Fos (Magenta) zum Nachweis eines Stimulationseffekts. Zellkerne sind mit dem DNA-markierenden Stoff DAPI angefärbt. **6B** („stim“) zeigt die C-Fos-Expression kurz nach einer Stimulationsdauer von 90 Minuten, während **6A** („nstim“) die unstimulierte Kontrolle darstellt. Die hellgrüne Linie markiert die Lage der Elektrodenspitze. Maßstableiste: 50  $\mu\text{m}$ .

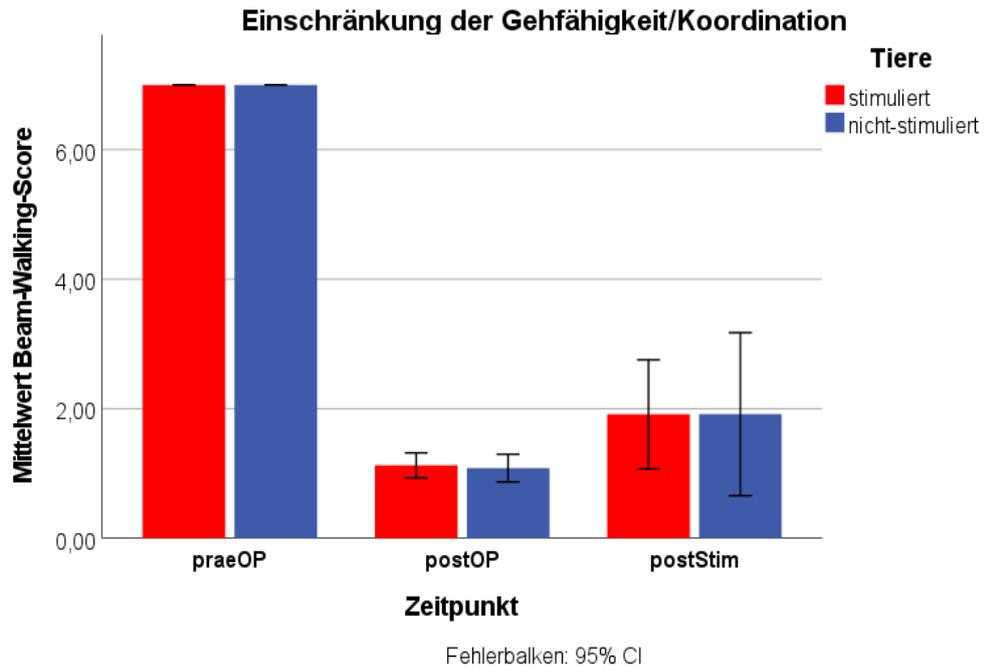
## Beam-Walking- und Ladder-Rung-Walking-Test

Vor der Induktion der Photothrombose und der Elektrodenimplantation stellten sich die Tiere beider Gruppen gleichermaßen unbeeinträchtigt und gut an den jeweiligen Test adaptiert dar (stimuliert vs. nicht-stimuliert; n = 8 vs. 6: Beam-Walking-Score:  $7,00 \pm 0,00$  vs.  $7,00 \pm 0,00$ ; Foot-Fall-Score:  $0,01 \pm 0,01$  vs.  $0,01 \pm 0,01$ ;  $p=0,82$ ; siehe Abbildung 7A, B).

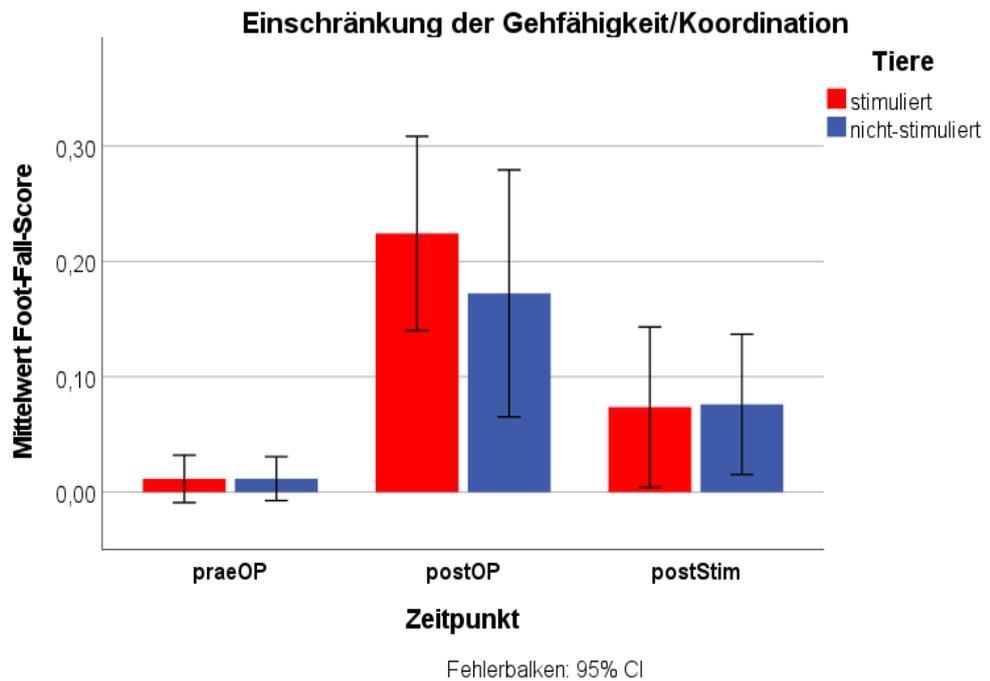
Nach Induktion der Photothrombose war in den Verhaltenstests zu beobachten, dass die Tiere entsprechend der Läsion im motorischen Kortex Defizite aufwiesen. Im Vordergrund stand hierbei die Unfähigkeit, das Gleichgewicht auf dem hölzernen Balken zu bewahren, darüber hinaus waren die Ratten nicht mehr in der Lage, die horizontale Leiter ohne Pausen oder Stolpern zu überqueren. Statistisch konnte der Effekt der Photothrombose bei allen Tieren durch den T-Test in ähnlichem Ausmaß deutlich gemacht werden. Dies zeigte sich bei allen Tieren im Beam-Walking-Test als Verminderung der Punktzahl (praeOP vs. postOP; n = 14:  $7,00 \pm 0,00$  vs.  $1,11 \pm 0,06$ ;  $p < 0,00$ ), während im Ladder-Rung-Walking-Test eine Erhöhung der Fehlerpunkte auftrat (praeOP vs. postOP; n = 14:  $0,01 \pm 0,01$  vs.  $0,20 \pm 0,03$ ;  $p < 0,00$ ). Zwischen Fall- und Kontrollgruppe gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Einflusses der Photothrombose (stimuliert vs. nicht-stimuliert; n = 8 vs. 6: Beam-Walking-Score:  $1,13 \pm 0,08$  vs.  $1,08 \pm 0,08$ ;  $p=0,48$ ; Foot-Fall-Score:  $0,22 \pm 0,04$  vs.  $0,17 \pm 0,04$ ;  $p=0,97$ ; siehe Abbildung 7A, B).

Auch am dritten Testtermin zeigten Fall- und Kontrollgruppe in der Gegenüberstellung ähnliche Werte (stimuliert vs. nicht-stimuliert: n = 8 vs. 6; Beam-Walking-Score:  $1,91 \pm 0,36$  vs.  $1,92 \pm 0,49$ ;  $p=0,78$ ; Foot-Fall-Score:  $0,07 \pm 0,03$  vs.  $0,07 \pm 0,02$ ;  $p=0,23$ ; siehe Abbildung 7A, B). Zwischen Fall- und Kontrollgruppe konnte somit zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied motorischer Defizite anhand der Verhaltenstestergebnisse festgestellt werden.

A



B



**Abbildung 6: Beam-Walking- und Ladder-Rung-Walking-Test**

**7A, B:** Darstellung der Gehfähigkeit und Koordination bzw. deren Einschränkung bei den Tieren, quantifiziert durch die Verhaltenstests. Dementsprechend kann man zeitlich drei Situationen unterscheiden: Die Motorik vor der Operation inklusive Photothrombose (praeOP) (stimuliert vs. nicht-stimuliert; n = 8 vs. 6; Beam-Walking-Score:  $7,00 \pm 0,00$  vs.  $7,00 \pm 0,00$ ; Foot-Fall-Score:  $0,01 \pm 0,01$  vs.  $0,01 \pm 0,01$ ;  $p=0,82$ ), den Zustand 2 Tage nach dem Eingriff (postOP) (stimuliert vs. nicht-stimuliert; n = 8

vs. 6: Beam-Walking-Score:  $1,13 \pm 0,08$  vs.  $1,08 \pm 0,08$ ;  $p=0,48$ ; Foot-Fall-Score:  $0,22 \pm 0,04$  vs.  $0,17 \pm 0,04$ ;  $p=0,97$ ;) und den Zustand nach der kontinuierlichen Stimulation respektive 13 Tage nach der Operation (postStim) (stimuliert vs. nicht-stimuliert:  $n = 8$  vs.  $6$ ; Beam-Walking-Score:  $1,91 \pm 0,36$  vs.  $1,92 \pm 0,49$ ;  $p=0,78$ ; Foot-Fall-Score:  $0,07 \pm 0,03$  vs.  $0,07 \pm 0,02$ ;  $p=0,23$ ). Der Mittelwert des jeweiligen Scores von der Fallgruppe (stimuliert) und der Kontrollgruppe (nicht-stimuliert) ist pro Zeitpunkt nebeneinander dargestellt. In **7A** wird die Motorik anhand des Beam-Walking-Score gezeigt und in **7B** anhand des Foot-Fall-Score.

## Diskussion

Immer mehr Studien weisen darauf hin, dass es nach einer zerebralen Ischämie nebst strukturellen auch zu funktionellen Veränderung von bestehenden neuronalen Netzwerken kommen kann (Zhang et al. 2017). Mittels funktioneller MRT-Bildgebung konnte in einer Arbeit nachgewiesen werden, dass die Konnektivität zwischen frontoparietaler motorischer Kontrollzentren und dem primären motorischen Kortex bei Schlaganfallpatienten im Vergleich zu gesunden Probanden verändert war (Inman et al. 2012).

Mit der tiefen Hirnstimulation besteht die Möglichkeit, pathologische Signale innerhalb des ZNS zu modulieren (vgl. Einleitung). In dieser Arbeit wurde die Wirkung der PPTg-Stimulation auf motorische Defizite nach photothrombotischer Läsion bei Ratten untersucht. Durch eine kontinuierliche Stimulation über 10 Tage sollte dabei eine Verbesserung der beeinträchtigten Gehfähigkeit im Rahmen einer kortikalen Ischämie erzielt werden. Weder anhand des Beam-Walking-Tests noch des Ladder-Rung-Walking-Tests ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Tieren hinsichtlich der Gehfähigkeit oder Koordination der Pfoten nachvollziehen. Dabei ist zu beachten, dass wir einen Stimulationseffekt anhand der c-Fos-Expression im die Elektroden Spitze umgebenden Gewebe exemplarisch zeigen konnten (siehe Abbildung 6). Unter Verwendung eines stereotaktischen Instruments zur Elektrodenimplantation trat eine Streuung bezüglich der tatsächlichen Elektrodenlage auf (siehe Abbildung 5). Bei einigen Tieren ist die Elektroden Spitze deutlich nach unten abweichend, d.h am ventralen Pol des PTTg, wiederzufinden.

Gemäß einer Studie kann jedoch davon ausgegangen werden, dass bei einer Intensität von 50  $\mu\text{A}$  ein biologisch wirksames elektrisches Feld innerhalb eines Radius von bis zu 700  $\mu\text{m}$  um die stimulierende Elektrode im Hirngewebe vorhanden ist (Ranck 1975; siehe Abbildung 2). Somit ist trotz der Variabilität der Elektrodenlage eine Stimulation des Zielgebietes aufgrund der Ausdehnung des elektrischen Feldes um die Elektrodenspitze bei allen Tieren der Fallgruppe anzunehmen.

Dem PPTg wird eine Rolle in den motorischen Schaltkreisen des Mittelhirns zuteil (siehe Abbildung 1). Bereits in einer frühen Studie von Skinner und Garcia-Rill konnte durch elektrische Stimulation im Bereich des CNF und PPTg eine Lokomotion im Sinne von Laufen induziert und gesteuert werden (Skinner and Garcia-Rill 1984). Klinische Studien im Rahmen von einer experimentellen Anwendung der tiefen Hirnstimulation bei der idiopathischen Parkinsonerkrankung haben ergeben, dass die Stimulation des PPTg mit niedrigen Frequenzen ( $< 80$  Hz) einen therapeutischen Effekt auf die im Rahmen des Parkinsonsyndroms auftretende Bewegungsstarre, dem sogenannten „Freezing of gait“ hat (Ferraye et al. 2010; Thevathasan et al. 2018). Andererseits konnte keine Verbesserung anderer Gangparameter, wie z.B. der Schrittlänge, festgestellt werden. Weiter wird davon ausgegangen, dass bei Patienten mit einer idiopathischen Parkinsonerkrankung der PPTg aufgrund von Degeneration und pathologischer Inhibition in seiner Aktivität reduziert ist. Dieses Defizit könne mithilfe der Stimulation im Sinne einer Aktivierung in begrenztem Maße verbessert werden (Thevathasan and Moro 2019). In einer weiteren Studie wurde die Rolle des PPTg anhand eines Parkinsonmodells untersucht (Gut and Winn 2015). In einem 6-OHDA-Rattenmodell - ein gut etabliertes Model für die Parkinsonerkrankung - wurde der PPTg entweder im anterioren oder posterioren Teil ausgeschaltet. Ebenso wurde die tiefe Hirnstimulation entweder im anterioren oder posterioren Anteil des PPTg durchgeführt. Die Versuche ergaben, dass die Stimulation des posterioren PPTg die Verbesserung einer L-DOPA bedingten Überbeweglichkeit im Parkinsonmodell bewirkt, während die Stimulation des anterioren Anteils des PPTg zu einer Bewegungsstarre führt. Allerdings ergaben die Versuche auch, dass eine funktionelle Ausschaltung des kompletten PPTg bei den Ratten keinerlei Einschränkung verschiedener Laufparameter

wie der Schrittlänge, der Koordination oder der Geschwindigkeit nach sich zog. Andere Tierversuche, bei denen der PPTg chemotoxisch ausgeschaltet wurde, führten ebenfalls zu keiner Einschränkung der Bewegung (Wilson, MacLaren, and Winn 2009). Wenn also auch eine gewisse Beteiligung des PPTg an den motorischen Schaltkreisen im Mesencephalon nachgewiesen scheint, so wird hieran auch klar, dass der PPTg nicht direkt für die Lokomotion verantwortlich ist (Gut and Winn 2015). Das Ergebnis dieser Arbeit lässt sich im Sinne der Erkenntnisse einordnen, welche eine Beteiligung des PPTg hinsichtlich der unmittelbaren Bewegungsaktivierung in Frage stellen.

Welches Gebiet im Mesencephalon nun diese zentrale Rolle im Sinne einer MLR einnimmt, bleibt weiterhin Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. In einer Arbeit von Sherman et al. werden glutamaterge Neurone im Bereich medial zum PPTg beschrieben, welche in das Vorderhorn im Rückenmark projizieren. Bei chemischer Stimulation dieser Neurone im Bereich des beschriebenen „lateralen pontinen Tegmentums“ mit Ibotensäure konnte ein rhythmisches Laufen der Ratten beobachtet werden (Sherman et al. 2015). Eine Studie mit dezerebrierten Katzen von Takakusaki et al. fand des Weiteren, dass die elektrische Stimulation des CNF Lokomotion induziert. Demgegenüber ergab die Stimulation des ventralen Anteils des PPTg eine Inhibition des Muskeltonus. Dieser Mechanismus wird der Aktivierung von cholinergen Neuronen innerhalb des PPTg zugeschrieben. Die Stimulation des dorsalen Anteils des PPTg hingegen bewirkte zunächst eine kurzfristige Zunahme der Lokomotion, die jedoch direkt in eine Verminderung der Lokomotion überging (Takakusaki et al. 2003). In der Arbeit von Fluri et al. wurde bei Ratten ebenfalls ein photothrombotischer Schlaganfall des sensomotorischen Kortex induziert. Anschließend konnte man durch unilaterale tiefe Hirnstimulation des CNF die Schlaganfall-bedingten motorischen Einschränkungen deutlich verbessern und eine deutliche Lokomotion im Sinne von Laufen induzieren (Fluri et al. 2017). In einem Tierversuch mit Primaten wurde beobachtet, dass eine Injektion von Ibotensäure in den CNF eine zervikale Dystonie und einen erhöhten Muskeltonus der proximalen vorderen Extremität kontralateral zur Folge hat (Gay et al. 2020). Darüber hinaus konnte bei diesen Tieren eine Erhöhung der Laufgeschwindigkeit im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden. Bei weiteren

Tieren wurde nach Injektion von Urotensin-II-konjugiertem Diphtherie-Toxin in den PPTg eine erhöhte Steifigkeit des proximalen Hinterlaufes kontralateral sowie eine herabgesetzte Laufgeschwindigkeit gesehen. Josset et al. konnten aufgrund von optogenetischen Versuchen mit transgenen Mäusen bestätigen, dass der CNF die primäre Rolle zur Initiierung und Aufrechterhaltung von Lokomotion im Mittelhirn darstellt. Während die Stimulation glutamaterger und cholinergischer Neurone des PPTg zu einer Verringerung der Laufgeschwindigkeit führte, konnte bei Stimulation glutamaterger Neurone des CNF die Initiierung von Lokomotion beim ruhenden Tier sowie die Steigerung der Geschwindigkeit beim laufenden Tier beobachtet werden (Josset et al. 2018). In einer anderen Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der Veränderung der Lokomotion und den Feuerraten glutamaterger Neuronen hergestellt werden. Dabei traten bei niedrigen Laufgeschwindigkeiten hohe Feuerraten in glutamatergen Neuronen des PPTg auf, während hohe Feuerraten in den glutamatergen Neuronen des CNF mit hohen Laufgeschwindigkeiten einhergingen (Caggiano et al. 2018). In der Zusammenschau dieser Erkenntnisse zeichnet sich ab, dass die Lokomotion, wie schon in anderen Studien vermutet, durch ein Zusammenspiel von Neuronen des CNF und des PPTg kontrolliert wird (Roseberry et al. 2016). Hierbei fällt dem CNF die Rolle des aktivierenden Zentrums zu, während der PPTg eher die Lokomotion herunterzuregulieren scheint (Josset et al. 2018). Darüber hinaus wurde von Caggiano et al. in ihrer Studie ein Zusammenhang zwischen der Inaktivierung von glutamatergen Neuronen des PPTg und einer Reduktion des explorativen Verhaltens gefunden (Caggiano et al. 2018). Der PPTg ist sehr wahrscheinlich auch noch bei weiteren neurologischen Funktionen involviert. Gay et al. vermuten, dass der PPTg durch seine Integration in verschiedene neuronale Funktionssysteme wie Kognition, Emotion und Motorik in der Lage ist, Bewegungen an die Anforderungen der aktuellen Situation anzupassen (Gay et al. 2020).

#### Einschränkungen dieser Arbeit

Die Aussagekraft dieser Arbeit wird durch verschiedene Faktoren eingeschränkt. Zum einen ist zu beachten, dass die Fallzahl in dem Versuch klein ist und daher die

Standardabweichungen in den Verhaltenstests große Werte erreichen. Zum anderen war das vorbereitende Training der Tiere auf die Verhaltenstests auf sieben Tage begrenzt. Da die Tests allerdings nach einer postoperativen Phase von zwei Tagen sowie nach einer Stimulationsdauer von zehn Tagen ohne zwischenzeitlichen Kontakt zu den Verhaltenstests durchgeführt wurden, stellt sich die Zeit der Gewöhnung relativ kurz dar. Allerdings konnte man nach dieser Trainingszeit im Beam-Walking-Test eine volle Punktzahl bei allen Tieren und im Ladder-Rung-Walking-Test einen geringen Foot-Fault-Score als Ausgangswerte festlegen. Des Weiteren bestehen Einschränkungen aufgrund der Art und Weise der tiefen Hirnstimulation. Wie im Kapitel Methodik erwähnt, wurde der Zeitraum der permanenten Stimulation ohne allgemein vorhandene Vorerfahrungen hierzu gewählt. Ob ein längerer Stimulationszeitraum bei der deutlich vorhandenen spontanen Erholung der Tiere einen signifikanten Unterschied bewirken kann, bleibt hier eine offene Frage. In dieser Arbeit wurde zudem konsequent eine Frequenz von 130 Hz zur Stimulation verwendet. Insofern können wir von einer hochfrequenten Stimulation reden, während eine Stimulation mit niedrigen Frequenzen hier keine Anwendung fand. Eine Stimulation des PPTg mit niedrigen Frequenzen wäre somit potenzieller Gegenstand weiterer Forschung.

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die kontinuierliche, hochfrequente Stimulation im Bereich des PPTg über 10 Tage einen positiven Effekt auf die motorischen Einschränkungen im Rahmen eines unilateralen Schlaganfalls des sensomotorischen Kortex im Tiermodell hat. Aufgrund der Resultate konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden. Dieses Ergebnis fügt sich letztendlich unter anderen Studienresultaten insofern ein, dass der PPTg nicht die aktivierenden Bahnen für eine Lokomotion zu versorgen scheint, sondern vermutlich eher eine regulatorische Rolle einnimmt (Caggiano et al. 2018). Insofern wird ein weiterer Hinweis geliefert, dass die MLR nicht aus einem einzelnen, bewegungsinduzierendem Zentrum besteht, sondern vielmehr einen multizentrischen Komplex darstellt, welches Lokomotion hinsichtlich

verschiedener Parameter beeinflusst (Ryczko and Dubuc 2013; Caggiano et al. 2018).  
Des Weiteren lässt sich sagen, dass der PPTg aufgrund der aktuellen Studienlage neben einer regulatorischen Beteiligung an der MLR auch noch in weiteren neurologischen Funktionen involviert ist, die der weiteren Erforschung bedürfen (Garcia-Rill et al. 2016).

## Literaturverzeichnis

Abo, Masahiro, Hideki Yamauchi, Masahiko Suzuki, Mio Sakuma, and Mitsuyoshi Urashima

2006 Facilitated Beam-Walking Recovery during Acute Phase by Kynurenic Acid Treatment in a Rat Model of Photochemically Induced Thrombosis Causing Focal Cerebral Ischemia. *Neurosignals* 15(2): 102–110.

<https://www.karger.com/Article/FullText/94876>, accessed May 12, 2018.

Adkins, DeAnna L., J. Edward Hsu, and Theresa A. Jones

2008 Motor Cortical Stimulation Promotes Synaptic Plasticity and Behavioral Improvements Following Sensorimotor Cortex Lesions. *Experimental Neurology* 212(1): 14–28.

Alderson, Helen L., Mary P. Latimer, and Philip Winn

2008 A Functional Dissociation of the Anterior and Posterior Pedunculopontine Tegmental Nucleus: Excitotoxic Lesions Have Differential Effects on Locomotion and the Response to Nicotine. *Brain Structure & Function* 213(1–2): 247–253.

Bachmann, Lukas C., Alina Matis, Nicolas T. Lindau, et al.

2013 Deep Brain Stimulation of the Midbrain Locomotor Region Improves Paretic Hindlimb Function after Spinal Cord Injury in Rats. *Science Translational Medicine* 5(208): 208ra146.

Benjamin, Emelia J., Michael J. Blaha, Stephanie E. Chiuve, et al.

2017 Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 135(10): e146–e603.

Binkofski, Ferdinand, and Rüdiger J. Seitz

2004 Modulation of the BOLD-Response in Early Recovery from Sensorimotor Stroke. *Neurology* 63(7): 1223–1229.

Bornstein, Natan M., Jeffrey L. Saver, Hans Christoph Diener, et al.

2019 An Injectable Implant to Stimulate the Sphenopalatine Ganglion for Treatment of Acute Ischaemic Stroke up to 24 h from Onset (ImpACT-24B): An International, Randomised, Double-Blind, Sham-Controlled, Pivotal Trial. *Lancet* (London, England).

Broderick, Joseph P., Yuko Y. Palesch, Andrew M. Demchuk, et al.

2013 Endovascular Therapy after Intravenous T-PA versus t-PA Alone for Stroke. *The New England Journal of Medicine* 368(10): 893–903.

- Cabelguen, Jean-Marie, Céline Bourcier-Lucas, and Réjean Dubuc  
2003 Bimodal Locomotion Elicited by Electrical Stimulation of the Midbrain in the Salamander *Notophthalmus Viridescens*. *The Journal of Neuroscience* 23(6): 2434–2439. <http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.23-06-02434.2003>, accessed August 22, 2020.
- Caggiano, V., R. Leiras, H. Goñi-Erro, et al.  
2018 Midbrain Circuits That Set Locomotor Speed and Gait Selection. *Nature* 553(7689): 455–460.
- Cramer, Steven C.  
2008a Repairing the Human Brain after Stroke: I. Mechanisms of Spontaneous Recovery. *Annals of Neurology* 63(3): 272–287.  
2008b Repairing the Human Brain after Stroke. II. Restorative Therapies. *Annals of Neurology* 63(5): 549–560.
- Cramer, Steven C., Rajendra Shah, Jenifer Juranek, Kit R. Crafton, and Vu Le  
2006 Activity in the Peri-Infarct Rim in Relation to Recovery from Stroke. *Stroke* 37(1): 111–115.
- De Reuck, J., D. Decoo, I. Lemahieu, et al.  
1997 Crossed Cerebellar Diaschisis after Middle Cerebral Artery Infarction. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 99(1): 11–16.
- Ehrenreich, Hannelore, Karin Weissenborn, Hilmar Prange, et al.  
2009 Recombinant Human Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 40(12): e647-656.
- Emberson, Jonathan, Kennedy R. Lees, Patrick Lyden, et al.  
2014 Effect of Treatment Delay, Age, and Stroke Severity on the Effects of Intravenous Thrombolysis with Alteplase for Acute Ischaemic Stroke: A Meta-Analysis of Individual Patient Data from Randomised Trials. *Lancet (London, England)* 384(9958): 1929–1935.
- Feigin, Valery L., Bo Norrving, and George A. Mensah  
2017 Global Burden of Stroke. *Circulation Research* 120(3): 439–448.
- Ferraye, M. U., B. Debû, V. Fraix, et al.  
2010 Effects of Pedunculopontine Nucleus Area Stimulation on Gait Disorders in Parkinson’s Disease. *Brain: A Journal of Neurology* 133(Pt 1): 205–214.

Fluri, Felix, Micheal Bieber, Jens Volkmann, and Christoph Kleinschnitz  
2015 Microelectrode Guided Implantation of Electrodes into the Subthalamic Nucleus of Rats for Long-Term Deep Brain Stimulation. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*(104).

Fluri, Felix, Uwe Malzahn, György A. Homola, et al.  
2017 Stimulation of the Mesencephalic Locomotor Region for Gait Recovery after Stroke. *Annals of Neurology* 82(5): 828–840.

Gage, Gregory J., Daryl R. Kipke, and William Shain  
2012 Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*(65).

Garcia-Rill, E.  
1986 The Basal Ganglia and the Locomotor Regions. *Brain Research* 396(1): 47–63.

Garcia-Rill, E., B. Luster, S. D’Onofrio, et al.  
2016 Implications of Gamma Band Activity in the Pedunculopontine Nucleus. *Journal of Neural Transmission* (Vienna, Austria: 1996) 123(7): 655–665.

Gay, Marion, Hayat Belaid, Alister Rogers, et al.  
2020 Anatomico-Functional Mapping of the Primate Mesencephalic Locomotor Region Using Stereotactic Lesions. *Movement Disorders* 35(5): 789–799.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mds.27983>, accessed July 27, 2020.

Gerloff, Christian, Khalaf Bushara, Alexandra Sailer, et al.  
2006 Multimodal Imaging of Brain Reorganization in Motor Areas of the Contralesional Hemisphere of Well Recovered Patients after Capsular Stroke. *Brain: A Journal of Neurology* 129(Pt 3): 791–808.

Goyal, Mayank, Andrew M. Demchuk, Bijoy K. Menon, et al.  
2015 Randomized Assessment of Rapid Endovascular Treatment of Ischemic Stroke. *The New England Journal of Medicine* 372(11): 1019–1030.

Grefkes, Christian, Dennis A. Nowak, Simon B. Eickhoff, et al.  
2008 Cortical Connectivity after Subcortical Stroke Assessed with Functional Magnetic Resonance Imaging. *Annals of Neurology* 63(2): 236–246.

Guridi, J., and A. M. Lozano

1997 A Brief History of Pallidotomy. *Neurosurgery* 41(5): 1169–1180; discussion 1180-1183.

Gut, Nadine K., and Philip Winn

2015 Deep Brain Stimulation of Different Pedunclopontine Targets in a Novel Rodent Model of Parkinsonism. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35(12): 4792–4803.

2016 The Pedunclopontine Tegmental Nucleus-A Functional Hypothesis from the Comparative Literature. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 31(5): 615–624.

Hacke, Werner, Geoffrey Donnan, Cesare Fieschi, et al.

2004 Association of Outcome with Early Stroke Treatment: Pooled Analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS Rt-PA Stroke Trials. *Lancet (London, England)* 363(9411): 768–774.

Hamzei, Farsin, Joachim Liepert, Christian Dettmers, Cornelius Weiller, and Michel Rijntjes

2006 Two Different Reorganization Patterns after Rehabilitative Therapy: An Exploratory Study with fMRI and TMS. *NeuroImage* 31(2): 710–720.

Harnack, Daniel, Christine Winter, Wassilios Meissner, et al.

2004 The Effects of Electrode Material, Charge Density and Stimulation Duration on the Safety of High-Frequency Stimulation of the Subthalamic Nucleus in Rats. *Journal of Neuroscience Methods* 138(1–2): 207–216.

Herrington, Todd M., Jennifer J. Cheng, and Emad N. Eskandar

2016 Mechanisms of Deep Brain Stimulation. *Journal of Neurophysiology* 115(1): 19–38.

Huang, Mark, Richard L. Harvey, Mary Ellen Stoykov, et al.

2008 Cortical Stimulation for Upper Limb Recovery Following Ischemic Stroke: A Small Phase II Pilot Study of a Fully Implanted Stimulator. *Topics in Stroke Rehabilitation* 15(2): 160–172.

Inman, Cory S., G. Andrew James, Stephan Hamann, et al.

2012 Altered Resting-State Effective Connectivity of Fronto-Parietal Motor Control Systems on the Primary Motor Network Following Stroke. *NeuroImage* 59(1): 227–237. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811911008780>, accessed July 29, 2020.

Jang, Sung Ho, Sang Ho Ahn, Jung Sang Ha, et al.

2006 Peri-Infarct Reorganization in a Patient with Corona Radiata Infarct: A Combined Study of Functional MRI and Diffusion Tensor Image Tractography. *Restorative Neurology and Neuroscience* 24(2): 65–68.

Jang, Sung Ho, Sung H. You, Yong-Hyun Kwon, et al.

2005 Cortical Reorganization Associated Lower Extremity Motor Recovery as Evidenced by Functional MRI and Diffusion Tensor Tractography in a Stroke Patient. *Restorative Neurology and Neuroscience* 23(5–6): 325–329.

Jenike, M. A.

1998 Neurosurgical Treatment of Obsessive-Compulsive Disorder. *British Journal of Psychiatry* 173(S35): 79–90.

[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007125000297936/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007125000297936/type/journal_article), accessed September 5, 2020.

Jensen, Alicia L., and Dominique M. Durand

2009 High Frequency Stimulation Can Block Axonal Conduction. *Experimental Neurology* 220(1): 57–70.

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488609003033>, accessed February 14, 2018.

Jordan, L. M.

1998 Initiation of Locomotion in Mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 860: 83–93.

Josset, Nicolas, Marie Roussel, Maxime Lemieux, et al.

2018 Distinct Contributions of Mesencephalic Locomotor Region Nuclei to Locomotor Control in the Freely Behaving Mouse. *Current Biology* 28(6): 884-901.e3.

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982218301611>, accessed July 27, 2020.

Kleim, Jeffrey A., Rochelle Bruneau, Penny VandenBerg, et al.

2003 Motor Cortex Stimulation Enhances Motor Recovery and Reduces Peri-Infarct Dysfunction Following Ischemic Insult. *Neurological Research* 25(8): 789–793.

Kolominsky-Rabas, Peter L., Peter U. Heuschmann, Daniela Marschall, et al.

2006 Lifetime Cost of Ischemic Stroke in Germany: Results and National Projections From a Population-Based Stroke Registry: The Erlangen Stroke Project. *Stroke* 37(5): 1179–1183. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.STR.0000217450.21310.90>, accessed May 15, 2019.

Krishnamurthi, Rita V., Valery L. Feigin, Mohammad H. Forouzanfar, et al.  
2013 Global and Regional Burden of First-Ever Ischaemic and Haemorrhagic Stroke during 1990-2010: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet. Global Health* 1(5): e259-281.

Kwon, Yong-Hyun, Chu-Hee Lee, Sang Ho Ahn, et al.  
2007 Motor Recovery via the Peri-Infarct Area in Patients with Corona Radiata Infarct. *NeuroRehabilitation* 22(2): 105–108.

Levy, Robert, Sean Ruland, Martin Weinand, et al.  
2008 Cortical Stimulation for the Rehabilitation of Patients with Hemiparetic Stroke: A Multicenter Feasibility Study of Safety and Efficacy. *Journal of Neurosurgery* 108(4): 707–714.

Lotze, Martin, Jochen Markert, Paul Sauseng, et al.  
2006 The Role of Multiple Contralesional Motor Areas for Complex Hand Movements after Internal Capsular Lesion. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26(22): 6096–6102.

Lozano, Andres M., and Nir Lipsman  
2013 Probing and Regulating Dysfunctional Circuits Using Deep Brain Stimulation. *Neuron* 77(3): 406–424.

Machado, Andre, and Kenneth B. Baker  
2012 Upside down Crossed Cerebellar Diaschisis: Proposing Chronic Stimulation of the Dentatothalamocortical Pathway for Post-Stroke Motor Recovery. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 6: 20.

Machado, MD, PhD, The Cleveland Clinic  
2016 Electrical Stimulation of the Dentate Nucleus for Upper Extremity Hemiparesis Due to Ischemic Stroke (EDEN). *ClinicalTrials.Gov*.  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02835443?term=db&cond=stroke&draw=2&rank=1>.

McIntyre, Cameron C., and Philip J. Hahn  
2010 Network Perspectives on the Mechanisms of Deep Brain Stimulation. *Neurobiology of Disease* 38(3): 329–337.

Metz, Gerlinde A., and Ian Q. Wishaw  
2009 The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and Its Practical Application. *Journal of Visualized Experiments*(28).  
<http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1204>, accessed January 7, 2018.

Morgan, J. I., D. R. Cohen, J. L. Hempstead, and T. Curran  
1987 Mapping Patterns of C-Fos Expression in the Central Nervous System after Seizure. *Science (New York, N.Y.)* 237(4811): 192–197.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group  
1995 Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *The New England Journal of Medicine* 333(24): 1581–1587.

Pantano, P., G. L. Lenzi, B. Guidetti, et al.  
1987 Crossed Cerebellar Diaschisis in Patients with Cerebral Ischemia Assessed by SPECT and 123I-HIPDM. *European Neurology* 27(3): 142–148.

Paxinos, George, and Charles Watson  
2007 *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney: Academic Press.

Pennypacker, K. R., J. S. Hong, and M. K. McMillian  
1995 Implications of Prolonged Expression of Fos-Related Antigens. *Trends in Pharmacological Sciences* 16(9): 317–321.

Plautz, Erik J., Scott Barbay, Shawn B. Frost, et al.  
2003 Post-Infarct Cortical Plasticity and Behavioral Recovery Using Concurrent Cortical Stimulation and Rehabilitative Training: A Feasibility Study in Primates. *Neurological Research* 25(8): 801–810.

Plow, Ela B., James R. Carey, Randolph J. Nudo, and Alvaro Pascual-Leone  
2009 Invasive Cortical Stimulation to Promote Recovery of Function after Stroke: A Critical Appraisal. *Stroke* 40(5): 1926–1931.

Plow, Ela B., and Andre Machado  
2014 Invasive Neurostimulation in Stroke Rehabilitation. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 11(3): 572–582.

Ranck, J. B.  
1975 Which Elements Are Excited in Electrical Stimulation of Mammalian Central Nervous System: A Review. *Brain Research* 98(3): 417–440.

Rathore, Saif S., Albert R. Hinn, Lawton S. Cooper, Herman A. Tyroler, and Wayne D. Rosamond

2002 Characterization of Incident Stroke Signs and Symptoms: Findings from the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke* 33(11): 2718–2721.

Rha, Joung-Ho, and Jeffrey L. Saver

2007 The Impact of Recanalization on Ischemic Stroke Outcome: A Meta-Analysis. *Stroke* 38(3): 967–973.

Richards, Lorie G., and Steven C. Cramer

2021 Advances in Stroke: Therapies Targeting Stroke Recovery. *Stroke* 52(1): 348–350.

Richards, Lorie G., Kim C. Stewart, Michelle L. Woodbury, Claudia Senesac, and James H. Cauraugh

2008 Movement-Dependent Stroke Recovery: A Systematic Review and Meta-Analysis of TMS and fMRI Evidence. *Neuropsychologia* 46(1): 3–11.

Ringleb, Peter A., Gerhard F. Hamann, Joachim Röther, et al.

2015 Akuttherapie Des Ischämischen Schlaganfalls – Ergänzung 2015 Rekanalisierende Therapie. Leitlinie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie.

Roseberry, Thomas K., A. Moses Lee, Arnaud L. Lalive, et al.

2016 Cell-Type-Specific Control of Brainstem Locomotor Circuits by Basal Ganglia. *Cell* 164(3): 526–537.

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415017018>, accessed July 28, 2020.

Ross, Shani E., Emily Lehmann Levin, Christy A. Itoga, et al.

2016 Deep Brain Stimulation in the Central Nucleus of the Amygdala Decreases “wanting” and “Liking” of Food Rewards. *The European Journal of Neuroscience* 44(7): 2431–2445.

Rudberg, Ann-Sofie, Eivind Berge, Anders Gustavsson, Per Näsman, and Erik Lundström

2018 Long-Term Health-Related Quality of Life, Survival and Costs by Different Levels of Functional Outcome Six Months after Stroke. *European Stroke Journal* 3(2): 157–164.

Ryczko, Dimitri, and Réjean Dubuc

2013 The Multifunctional Mesencephalic Locomotor Region. *Current Pharmaceutical Design* 19(24): 4448–4470.

- Secades, Julio J., José Alvarez-Sabín, José Castillo, et al.  
2016 Citicoline for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review and Formal Meta-Analysis of Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Trials. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association* 25(8): 1984–1996.
- Shen, Ke-Zhong, Zi-Tao Zhu, Adam Munhall, and Steven W. Johnson  
2003 Synaptic Plasticity in Rat Subthalamic Nucleus Induced by High-Frequency Stimulation. *Synapse (New York, N.Y.)* 50(4): 314–319.
- Sherman, David, Patrick M. Fuller, Jacob Marcus, et al.  
2015 Anatomical Location of the Mesencephalic Locomotor Region and Its Possible Role in Locomotion, Posture, Cataplexy, and Parkinsonism. *Frontiers in Neurology* 6. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2015.00140/abstract>, accessed December 19, 2016.
- Shik, M. L., F. V. Severin, and G. N. Orlovskii  
1966 [Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain]. *Biofizika* 11(4): 659–666.
- Sirén, A. L., M. Fratelli, M. Brines, et al.  
2001 Erythropoietin Prevents Neuronal Apoptosis after Cerebral Ischemia and Metabolic Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(7): 4044–4049.
- Skinner, R. D., and E. Garcia-Rill  
1984 The Mesencephalic Locomotor Region (MLR) in the Rat. *Brain Research* 323(2): 385–389.
- Srinivasan, Ashok, William Miller, Peter Stys, and Mayank Goyal  
2004 Crossed Cerebellar Diaschisis in Stroke. *Neurology* 62(11): 2130.
- Steeves, J. D., G. N. Sholomenko, and D. M. Webster  
1987 Stimulation of the Pontomedullary Reticular Formation Initiates Locomotion in Decerebrate Birds. *Brain Research* 401(2): 205–212.
- Stinear, Cathy M., P. Alan Barber, James P. Coxon, Melanie K. Fleming, and Winston D. Byblow  
2008 Priming the Motor System Enhances the Effects of Upper Limb Therapy in Chronic Stroke. *Brain: A Journal of Neurology* 131(Pt 5): 1381–1390.

Takakusaki, K., T. Habaguchi, J. Ohtinata-Sugimoto, K. Saitoh, and T. Sakamoto  
2003 Basal Ganglia Efferents to the Brainstem Centers Controlling Postural Muscle Tone and Locomotion: A New Concept for Understanding Motor Disorders in Basal Ganglia Dysfunction. *Neuroscience* 119(1): 293–308.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452203000952>, accessed July 28, 2020.

Takeuchi, Naoyuki, Takeo Tada, Masahiko Toshima, et al.  
2008 Inhibition of the Unaffected Motor Cortex by 1 Hz Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Enhances Motor Performance and Training Effect of the Paretic Hand in Patients with Chronic Stroke. *Journal of Rehabilitation Medicine* 40(4): 298–303.

Teskey, G. Campbell, Corey Flynn, Crystal D. Goertzen, Marie H. Monfils, and Nicole A. Young  
2003 Cortical Stimulation Improves Skilled Forelimb Use Following a Focal Ischemic Infarct in the Rat. *Neurological Research* 25(8): 794–800.

Thevathasan, Wesley, Bettina Debu, Tipu Aziz, et al.  
2018 Pedunculo-pontine Nucleus Deep Brain Stimulation in Parkinson's Disease: A Clinical Review. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 33(1): 10–20.

Thevathasan, Wesley, and Elena Moro  
2019 What Is the Therapeutic Mechanism of Pedunculo-pontine Nucleus Stimulation in Parkinson's Disease? *Neurobiology of Disease* 128: 67–74.

von Monakow C  
1914 Die Lokalisation Im Grosshirn Und Der Abbau Der Funktion Durch Kortikale Herde. *In Die Diaschisis*. Pp. 26–34. Wiesbaden: JF Bergmann.

Ward, Nick S., Jennifer M. Newton, Orlando B. C. Swayne, et al.  
2007 The Relationship between Brain Activity and Peak Grip Force Is Modulated by Corticospinal System Integrity after Subcortical Stroke. *The European Journal of Neuroscience* 25(6): 1865–1873.

Wilson, David I. G., Duncan A. A. MacLaren, and Philip Winn  
2009 Bar Pressing for Food: Differential Consequences of Lesions to the Anterior versus Posterior Pedunculo-pontine. *European Journal of Neuroscience* 30(3): 504–513.  
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2009.06836.x>, accessed July 25, 2020.

Zhang, Jingna, Ye Zhang, Li Wang, et al.  
2017 Disrupted Structural and Functional Connectivity Networks in Ischemic Stroke Patients. *Neuroscience* 364: 212–225.

## Appendix

I: Abkürzungsverzeichnis

II: Abbildungsverzeichnis

III: Tabellenverzeichnis

IV: Curriculum vitae

V: Erklärung Eigenanteil/Fremdanteil

VI: Danksagung

VII: Eigene Veröffentlichung

## I: Abkürzungsverzeichnis

AP = anterior/posterior

CNF = cuneiformer Nucleus

DRV = Dorsale Raphe Nuclei, ventraler Anteil

DV = dorsal/ventral

DTI = *diffusion tensor imaging* = Diffusions Tensor Bildgebung

fMRT = funktionelle Magnet-Resonanz-Tomographie

HE = Hämatoxylin und Eosin

ML = medial/lateral

MLR = mesenzephaler lokomotorischer R

MRN = mesenzephaler retikulärer Nucleus

MRT = Magnet-Resonanz-Tomographie

PPTg = pedunkulopontiner tegmentaler Nucleus

THS = tiefe Hirnstimulation

T-1 = Tag vor Operation

T2 = zweiter Tag nach Operation

T3 = dritter Tag nach Operation

T13 = 13. Tag nach Operation

ZNS = zentrales Nervensystem

## II: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verbindungen des PPTg .....	Seite 9
Abbildung 2: Zielposition der Elektrodenimplantation .....	Seite 12
Abbildung 3: Versuchsübersicht .....	Seite 16
Abbildung 4: Betrachtung der Photothrombose	
A, B: Mikroskopische Darstellung .....	Seite 26
C: Makroskopische Ansicht .....	Seite 27
D: Infarktolumina .....	Seite 28
Abbildung 5: Lage der Elektrodenspitze	
A: Repräsentativer Hirnschnitt in HE-Färbung.....	Seite 29
B, C: Schematische Darstellung der Elektrodenpositionen .....	Seite 30
Abbildung 6 A, B: C-Fos-Expression .....	Seite 31
Abbildung 7 A, B: Beam-Walking- und Ladder-Rung-Walking-Test .....	Seite 33-34

### III: Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stromstärkenschwellen zur Induktion von ..... Seite 15  
motorischen Reaktionen

Tabelle 2: Beam-Walking-Score ..... Seite 18

Tabelle 3: Postoperative Gewichtskontrolle ..... Seite 24-25

## IV: Curriculum vitae

### PERSÖNLICHES

---

Name: Arne Bohr  
Adresse: Büdinger Str. 8, 60435 Frankfurt a.M.  
Mobil: 0 151 70512009  
E-Mail-Adresse: arne.bohr@gmx.de  
Geburtsdaten: 18. März 1995 in Lüneburg  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### AKADEMISCHE LAUFBAHN

---

05/2014 Absolvierung des „Medizinertests“ (TMS) – Rang 96%  
10/2014 – 06/2021 Studium der Humanmedizin/Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
08/2016 Absolvierung des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung, Gesamtnote 1.5  
07/2017 – 02/2017 Forschungssemester zur Vorbereitung einer Dissertation im Fachbereich der Neurologie bei Priv.-Doz. Dr. med. Felix Fluri, Universitätsklinikum Würzburg  
04/2021 Absolvierung des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung mit „gut“  
06/2021 Absolvierung des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung mit „sehr gut“,  
Absolvierung der ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote 1.5  
2021 Veröffentlichung eines Papers mit dem Titel „Continuous stimulation of the pedunculo-pontine tegmental nucleus has no impact on skilled walking in rats after photothrombotic stroke“ in „Current Neurovascular Research“

### SCHULAUSSBILDUNG

---

08/2001 – 07/2005 St. Ursula Schule Lüneburg  
08/2005 – 06/2013 Gymnasium Wilhelm-Raabe-Schule Lüneburg, Abitur 2013, Gesamtnote 1.5  
Leistungsfächer: Physik, Biologie, Mathematik

### BERUFLICHE LAUFBAHN

---

10/2021 Assistenzarztstelle in der Neurologischen Klinik am Krankenhaus Nordwest, Frankfurt am Main

## V: Erklärung Eigenanteil/Fremdanteil

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit von mir selbst angefertigt wurde und dass alle hierzu nötigen Arbeitsschritte von mir durchgeführt worden sind, sofern nicht im Folgenden anderweitig aufgeführt:

1. Konzeptplanung: In Zusammenarbeit mit Herrn Priv.-Doz. Dr. Fluri
2. Erlernen und Einübung chirurgischer Techniken: Unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Fluri
3. Anleitung zur Durchführung der Verhaltenstests: Herr Priv.-Doz. Dr. Fluri
4. Erlernen und Einübung histologischer Aufarbeitungstechniken:
  - Gewebeentnahme und Konservierung: Einführung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. Fluri und Frau Helga Brunner
  - Weiterverarbeitung des Gewebes zu Paraffinblöcken, Erstellen von histologischen Präparaten sowie deren Färbung mit HE: Unter Anleitung von Frau Andrea Sauer-Weckert. Hierbei teilweise Durchführung der histologischen Aufarbeitung durch Frau Andrea Sauer-Weckert (<20% der gesamten histologischen Aufarbeitung)
5. In-situ-Hybridisierung zur Darstellung der C-Fos-Expression: Durchführung Herr Dr. rer. nat. Michael Schuhmann und Frau Lena Papp.
6. Statistische Analyse der Daten: Mit beratender Unterstützung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. Fluri und Herrn Dr. rer. nat. Michael Schuhmann

## VI: Danksagung

An dieser Stelle darf ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Fluri für die hervorragende Betreuung bei dieser Arbeit danken. In Hinblick auf die Versuchsdurchführung möchte ich Frau Andrea Sauer-Weckert meine Dankbarkeit für Ihre ausgezeichnete technische Hilfe ausdrücken.

Nicht nur für die finanzielle, sondern auch für die moralische Unterstützung gebührt meinen Eltern ein besonderer Dank.

## VII: Eigene Veröffentlichung

Bohr, Arne, Michael K. Schuhmann, Lena Papp, Jens Volkmann, and Felix Fluri  
2021 Deep Brain Stimulation for Stroke: Continuous Stimulation of the  
Pedunclopontine Tegmental Nucleus Has No Impact on Skilled Walking in Rats After  
Photothrombotic Stroke. *Current Neurovascular Research* 17(5): 636–643.  
<https://www.eurekaselect.com/188573/article>, accessed July 10, 2021.