

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Allgemeine Neurologie  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Wiendl -

**Der Einfluss von Citicolin (CDP-Cholin)  
auf die neuronale und funktionelle Regeneration  
im Schlaganfallmodell der Ratte**

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Altach, Elena  
aus Omsk (Russland)  
2014

Gedruckt mit Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv. -Doz. Dr. med. Jens Minnerup

2. Berichterstatter: Priv. -Doz. Dr. med. Chr. Ertmer

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Allgemeine Neurologie  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Wiendl -  
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Jens Minnerup  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Chr. Ertmer

## ZUSAMMENFASSUNG

### **Der Einfluss von Citicolin (CDP-Cholin) auf die neuronale und funktionelle Regeneration im Schlaganfallmodell der Ratte**

Altach, Elena

Citicolin ist ein Zwischenprodukt der Biosynthese des membranständigen Phospholipids Phosphatidylcholin. Experimentelle Studien zeigen, dass die akute Behandlung mit Citicolin neuroprotektive Effekte nach einem ischämischen Insult induziert. Die Schlüsselmechanismen hierfür sind die anti-exzitatorischen, anti-oxidativen, anti-apoptotischen und membran-stabilisierenden Eigenschaften von Citicolin. Hinweise für eine neuroprotektive Wirkung von Citicolin zeigten sich auch in klinischen Studien. Ob Citicolin auch die Regeneration nach einem Schlaganfall fördert, ist bislang unbekannt.

Das Ziel dieser Studie ist, Citicolin hinsichtlich seiner neuroregenerativen Wirkung in der subakuten Phase nach einem Insult in einem Schlaganfallmodell der Ratte zu untersuchen. Zur Induktion der Ischämie wurde das Modell der Fotothrombose verwendet. Vierundzwanzig Stunden nach Ischämieinduktion wurde eine Therapie mit 100 mg/kg Citicolin täglich für 10 Tage begonnen. Die funktionelle Erholung nach dem Infarkt wurde mittels Zylindertest, Rotarod-Test und *Adhesive tape removal* Test erfasst. Nach vier Wochen erfolgten histologische Analysen zur Quantifizierung der Infarktvolumina mittels Toluidinfärbung und der Neurogenese mittels BrdU/NeuN- und DCX- Färbung.

Die Behandlung mit Citicolin führte zu einer signifikant verbesserten funktionellen Erholung im *Adhesive tape removal* Test und im Zylindertest ( $P < 0,05$ ). Zudem führte die pharmakologische Stimulation mit Citicolin zu einer signifikant erhöhten Neubildung von Neuronen im Hippokampus sowie in der Subventrikulärzone (SVZ) ( $P < 0,05$ ).

Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass die Therapie mit Citicolin im Schlaganfallmodell der Ratte die strukturelle und funktionelle Erholung nach einem ischämischen Insult fördert. Die neuroregenerativen Eigenschaften und die verbesserte funktionelle Erholung verdeutlichen das Potential von Citicolin als aussichtsreichen Therapieansatz zur Behandlung des ischämischen Schlaganfalls.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2014

Genehmigung des Tierversuches: 28.12.2011, Aktenzeichen 84-02.04.2011.A156

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel

### **Der Einfluss von Citicolin (CDP-Cholin) auf die neuronale und funktionelle Regeneration im Schlaganfallmodell der Ratte**

im Universitätsklinikum Münster,  
in der Klinik für Allgemeine Neurologie,

unter Anleitung von Priv. -Doz. Dr. med. Jens Minnerup

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt  
und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder  
ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur  
Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, den 23.09.2013

Unterschrift: \_ \_ \_ \_ \_

---

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Der ischämische Schlaganfall.....	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Epidemiologie.....	1
1.1.3	Ätiologie.....	2
1.1.4	Klinik.....	2
1.1.5	Pathophysiologie.....	2
1.1.6	Endogene Reparaturmechanismen.....	3
1.1.6.1	Neurogenese.....	4
1.1.7	Therapieempfehlungen.....	6
1.2	Citicolin in der Therapie des Schlaganfalls.....	7
1.2.1	Pharmakologie.....	7
1.2.2	Wirkmechanismen von Citicolin in der Schlaganfallbehandlung.....	8
1.3	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	10
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>11</b>
2.1	Versuchsablauf.....	11
2.2	Versuchstiere.....	11
2.3	Wahl des Versuchsmodells.....	12
2.4	Fotothrombotischer Schlaganfall.....	13
2.4.1	Narkose.....	13
2.4.2	Intraoperative Lagerung.....	13
2.4.3	Einsetzen eines Katheters in die <i>Vena femoralis</i> .....	14
2.4.4	Präparation der Kalotte.....	14
2.4.5	Induktion der ischämischen Läsion.....	14
2.5	Therapie.....	14
2.6	BrdU-Gabe.....	15
2.7	Sensomotorische Verhaltenstests.....	15
2.7.1	Rotarod-Test.....	16
2.7.2	<i>Adhesive tape removal Test</i> .....	17
2.7.3	Zylindertest.....	18

---

2.8	Histologische Untersuchungen .....	20
2.8.1	Allgemeines Vorgehen .....	20
2.8.2	Toluidinfärbung .....	20
2.8.2.1	Auswertung der Toluidinfärbung .....	21
2.8.3	BrdU/NeuN-Färbung .....	21
2.8.3.1	Auswertung der BrdU/NeuN-Färbung: .....	24
2.8.4	DCX-Färbung .....	24
2.8.4.1	Auswertung der DCX-Färbung.....	25
2.9	Statistische Auswertung.....	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
3.1	Ergebnisse der Verhaltenstests .....	27
3.1.1	Zylindertest .....	27
3.1.2	<i>Adhesive tape removal</i> Test .....	28
3.1.3	Rotarod-Test .....	29
3.1.4	Körpergewicht .....	30
3.2	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen .....	30
3.2.1	Toluidinfärbung .....	30
3.2.2	BrdU/NeuN-Färbung .....	31
3.2.3	DCX-Färbung .....	36
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>37</b>
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	37
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	37
4.2.1	Verhaltenstests .....	37
4.2.2	Histologische Untersuchungen .....	38
4.3	Diskussion der Methoden .....	40
4.4	Klinische Implikation .....	41
4.5	Fazit und Ausblick.....	44
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>45</b>

---

<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>64</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>65</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der ischämische Schlaganfall

### 1.1.1 Definition

Das Krankheitsbild „Schlaganfall“ ist durch ein plötzlich einsetzendes fokalneurologisches Defizit gekennzeichnet. Man unterteilt Schlaganfälle grob in ischämische und hämorrhagische Insulte. Die ischämischen Schlaganfälle sind mit 80-85 % die häufigsten, wohingegen intrazerebrale und sonstige intrakranielle Blutungen in epidemiologischen Untersuchungen einen Anteil von 10 bis 15 % ausmachen (Kolominsky-Rabas *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wird der Begriff „ischämischer Schlaganfall“ für alle Formen der akuten fokalen zerebralen Ischämie verwendet.

Der ischämische Schlaganfall wird durch einen lokalen Gefäßverschluss verursacht, der zu einem Verlust der Sauerstoff- und Glukoseversorgung führt. Als Folge kommt es zu einem Zusammenbruch des Funktions- und schließlich Erhaltungsstoffwechsels im betroffenen Hirnareal (Diener *et al.*, 2004).

### 1.1.2 Epidemiologie

Der Schlaganfall ist in den Industrienationen nach Herzinfarkt und Malignomen die dritthäufigste Todesursache und eine der häufigsten Ursachen für erworbene Behinderungen (Johnston *et al.*, 2009). Die Häufigkeit des Schlaganfalls in der deutschen Bevölkerung wird anhand der Inzidenzraten aus dem Erlanger Schlaganfall Register geschätzt. Die Daten aus dem Register zeigen, dass in Deutschland jährlich ca. 262 000 Menschen einen Schlaganfall erleiden (Kolominsky-Rabas *et al.*, 2006; Heuschmann *et al.*, 2010).

Der Schlaganfall hat eine enorme sozioökonomische Bedeutung. Derzeit werden in den westlichen Industrienationen ca. 2–5 % der gesamten Gesundheitskosten durch den Schlaganfall verursacht (Saka *et al.*, 2009). In Deutschland werden die direkten Kosten für die Versorgung von Patienten mit erstmaligem ischämischen Hirninfarkt in den nächsten 20 Jahren auf ca. 108 Milliarden Euro geschätzt (Heuschmann, 2009).

### 1.1.3 Ätiologie

Die Hirninfarkte sind hinsichtlich ihrer Ursachen heterogen. Nach der sogenannten TOAST-Klassifikation (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*) wird die Ätiologie der ischämischen Insulte in folgende Gruppen eingeteilt: Schlaganfälle durch zerebrale Mikro- oder Makroangiopathie, durch kardiale Embolien und durch andere seltenere Ursachen (z. B. Dissektion, Vaskulitis, Gerinnungsstörung). Teilweise bleibt die Ätiologie ungeklärt.

### 1.1.4 Klinik

Die klinischen Symptome des Schlaganfalls unterscheiden sich erheblich je nach dem betroffenen Teil des Gehirns. Die Unterteilung der Infarktgebiete orientiert sich an den großen Hirnarterien und ihren Versorgungsgebieten. Bei der arteriellen Versorgung wird zwischen der vorderen und der hinteren Strombahn unterschieden. Zu der vorderen Strombahn zählen die *A. carotis interna* (ACI) und ihre Äste, die *A. cerebri media* (ACM) und *A. cerebri anterior* (ACA). Zu der hinteren Strombahn zählen die *A. vertebralis* (AV), die *A. basilaris* (AB), die *A. cerebri posterior* (ACP) und die Kleinhirnarterien (Diener *et al.*, 2004).

Infarkte der vorderen Strombahn machen ca. 75 % aller Hirninfarkte aus. Verschlüsse im Bereich der Aufzweigung der ACI in die ACM und in die ACA führen zum schweren hemisphärischen Syndrom mit kontralateraler Hemiparese, Hemianästhesie, Hemianopsie sowie Aphasie und Apraxie. Ist die ACM betroffen sind die typischen Symptome die brachiofazial betonte kontralaterale Hemiparese, Hemihypästhesie und die Hemianopsie. Beim Verschluss der ACA stehen die kontralaterale Hemiparese und Hemihypästhesie, eine Antriebsstörung und die transkortikale motorische Aphasie im Vordergrund (Diener *et al.*, 2004).

### 1.1.5 Pathophysiologie

Der Hirnstoffwechsel benötigt als Energielieferant fast ausschließlich Glukose. Im Rahmen des Schlaganfalls entsteht eine Unterversorgung des betroffenen Areals mit Sauerstoff und Glukose, es kommt zu pathologischen Abläufen, die wenige Minuten bis

mehrere Tage anhalten. Die wichtigsten Mechanismen, die zum Untergang der Zellen beitragen sind die Exzitotoxizität, die Peri-Infarkt-Depolarisation und die Apoptose. Die Schadenssequenz fängt zeitlich überlappend mit den Phasen der Exzitotoxizität und der Peri-Infarkt-Depolarisation an, gefolgt von der Apoptose (Dirnagl *et al.*, 1999; Hossmann, 2005).

Kommt es in Folge des Gefäßverschlusses zum Substratmangel, wird die Energieversorgung auf Glykolyse umgestellt. Als Abfallprodukt entsteht Laktat, welches zu einer intrazellulären Azidose, Denaturierung von Membranproteinen und Enzymen sowie einer Erhöhung der Zellmembranpermeabilität führt (Siesjö, 1992; Hossmann, 1987). Als Folge resultiert eine Depolarisation von Nervenzellen - die Nervenzellen sind nicht mehr elektrisch erregbar. Nach dem Zusammenbruch des Membranpotenzials kommt es zur Anreicherung der exzitatorischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat im extrazellulären Raum (Katsura *et al.*, 1994; Nedergaard *et al.*, 2005; Doyle *et al.*, 2008). Glutamat bewirkt den Einstrom von Natrium und Calcium in die Zelle, wodurch zahlreiche Enzyme aktiviert werden, die zur Zerstörung der Zellmembran und Strukturproteine beitragen. In den geschädigten Zellen werden apoptotische Prozesse in Gang gesetzt und es folgt der Untergang der Zelle (Werner, 2000; Siesjö, 1993; Hamann, 1997).

Wichtig für das Verständnis und die Entwicklung neuer Therapiekonzepte ist das sogenannte Penumbra-Konzept. Dabei unterteilt man den von der Ischämie betroffenen Bereich in den Infarktkern und die Penumbra-Region. Als Penumbra wird der Bereich zwischen Funktions- und Infarzierungsschwelle genannt. Das Gewebe in der Penumbrazone ist zwar funktionell beeinträchtigt, die strukturelle Integrität und ein lebenserhaltender Energiestoffwechsel sind aber noch vorhanden. Somit ist die Penumbra der Bereich des Infarkts, der potentiell zu retten ist (Eguchi *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 1996).

### **1.1.6 Endogene Reparaturmechanismen**

Nach einem Schlaganfall kommt es im unterschiedlichen Ausmaß zu einer Wiederherstellung neurologischer Funktionen. Während die Erholung in den ersten Tagen zum größten Teil auf den Rückgang des Hirnödems und die Reperfusion der

Penumbra zurückzuführen ist, liegen der späteren Erholung vor allem die Plastizität und die Neuroregeneration des Gehirns zugrunde. Die Neuroregeneration ist dabei der Oberbegriff für Vorgänge, die zur Wiederherstellung verloren gegangener Nervenzellfunktionen bzw. zum Ersatz der untergegangenen Nervenzellen führt. Hierzu zählen unter anderem die Neurogenese und die dendritische Plastizität.

Als dendritische Plastizität wird die Fähigkeit der Dendriten bezeichnet, sich in ihrer Form und in ihren Eigenschaften zu verändern (Urbanska *et al.*, 2008). Eine gesteigerte dendritische Plastizität wurde unter anderem nach kortikalen Läsionen nachgewiesen (Kolb *et al.*, 1998; Wallace *et al.*, 1992). Nach fokaler kortikaler Ischämie finden sich im Penumbraareal dendritische Schäden. Hierzu zählen eine Reduktion der Gesamtlänge der Dendriten und eine reduzierte Anzahl der dendritischen Verzweigungen (Akulinin *et al.*, 1997; Enright *et al.*, 2007). In der Regenerationsphase nach einer Ischämie wachsen die Dendriten wieder, bilden neue Verzweigungen und können so dazu beitragen, dass teilweise Funktionen untergegangener Neuronen kompensiert werden (Rossini *et al.*, 2007). In mehreren Arbeiten wurde der Zusammenhang zwischen diesen Reorganisationsvorgängen und der funktionellen Regeneration nachgewiesen (Dijkhuizen *et al.*, 2001; Dijkhuizen *et al.*, 2003; Rossini *et al.*, 2007).

#### **1.1.6.1 Neurogenese**

Als weiterer bedeutsamer Mechanismus hinsichtlich der Funktionsverbesserung nach einem Schlaganfall wird die Neurogenese angesehen. Dementsprechend wurde in der Vergangenheit die therapeutische Beeinflussung der Neurogenese zur Funktionsverbesserung nach einem Schlaganfall wiederholt untersucht (Hurtado *et al.*, 2006).

Unter Neurogenese versteht man die Neubildung von Nervenzellen aus Stamm- oder Vorläuferzellen. Ende des 20. Jahrhunderts konnten viele Arbeiten die Neurogenese in verschiedenen Regionen des adulten Gehirns von Säugetieren nachweisen (Alvarez-Buylla *et al.*, 2002; Gage, 2000; Kempermann *et al.*, 2000). Die Bildung einer größeren Zahl neuer Nervenzellen aus Stammzellen findet während des gesamten Lebens statt. Man geht davon aus, dass sich im Gehirn neuronale Stammzellen befinden, die sich zum einen unbegrenzt teilen können und zum anderen Tochterzellen generieren, die sowohl zu verschiedenen Typen von Gliazellen, als auch zu Neuronen ausdifferenzieren

(Eriksson *et al.*, 1998). Beim Menschen konnten bis zu einem Alter von über 70 Jahren neu gebildete Nervenzellen nachgewiesen werden (Jin *et al.*, 2004).

Es ist bekannt, dass die Neurogenese in der Subventrikulärzone und in einem Teil des Hippokampus, dem *Gyrus dentatus*, stattfindet. Die neuronalen Vorläuferzellen aus der subgranulären Zone migrieren zum *Gyrus dentatus* des Hippokampus und differenzieren dort zu reifen Neuronen. Die neuronalen Vorläuferzellen der Subventrikulärzone migrieren in den Bulbus olfactorius, wo sie zu reifen Neuronen differenzieren (Kuhn *et al.*, 1996; Lois *et al.*, 1996).

Die Neubildung von Gehirnzellen im Erwachsenenalter konnte bisher bei allen untersuchten Säugetierspezies, einschließlich des Menschen und anderer Primaten, nachgewiesen werden (Eriksson *et al.*, 1998; Gould *et al.*, 1998; Tonchev *et al.*, 2003).

Über die Mechanismen der Differenzierung oder die Funktion neu gebildeter Neuronen im adulten Gehirn ist bisher wenig bekannt. Dennoch wurde gezeigt, dass die Neurogenese zahlreichen exogenen und endogenen Einflussfaktoren unterliegt. Zu den bislang identifizierten Einflussfaktoren gehören unter physiologischen Bedingungen ein höheres Lebensalter, Stress, geschlechtsspezifische und saisonale Einflüsse und körperliche Aktivität (Gould *et al.*, 1992; Seki *et al.*, 1995; Kuhn *et al.*, 1996; Gould *et al.*, 1997; Kempermann *et al.*, 1997a; Kempermann *et al.*, 1997b; Kempermann *et al.*, 1998; Kempermann *et al.*, 1999; Cameron *et al.*, 1999; Galea *et al.*, 1999; Van Praag *et al.*, 1999a; Van Praag *et al.*, 1999b).

Zudem ist bekannt, dass die Neurogenese nicht nur unter physiologischen Bedingungen stattfindet, sondern auch durch pathophysiologische Ereignisse beeinflusst wird. Sie wird durch Läsionen des Gehirns, wie z. B. durch eine zerebrale Ischämie, ein Schädel-Hirn-Trauma oder einen epileptischen Anfall, gesteigert (Parent *et al.*, 1997). Eine bedeutende Rolle kommt dem programmierten Zelltod zu. Die Apoptose dient als zentraler Stimulus von Proliferation und Migration neuronaler Vorläuferzellen zum Ort der Schädigung (Kee *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1998).

Die Rolle der gesteigerten Neurogenese unter pathologischen Bedingungen wurde insbesondere beim Schlaganfall intensiv untersucht. Mehrere Autoren konnten zeigen, dass es nach einer zerebralen Ischämie zu einer gesteigerten Neubildung von Nervenzellen im *Gyrus dentatus* kommt. Dieses wurde zuerst bei der Wüstenrennmaus gezeigt (Liu *et al.*, 1998). Es folgte 1999 der Nachweis bei der Maus (Takagi *et al.*, 1999)

und bei der Ratte 1992 (Jin *et al.*, 2001; Kee *et al.*, 2001; Yagite *et al.*, 2001; Takasawa *et al.*, 2002). Neben einer Induktion der Neurogenese wurde in vielen Studien nachgewiesen, dass der ischämische Schlaganfall die Migration der Vorläuferzellen zum Ort der Ischämie bewirkt (Zhang *et al.*, 2008; Walter *et al.*, 2010; Kreuzberg *et al.*, 2010; Gotts und Chesselet, 2005; Hua *et al.*, 2008). In frühen experimentellen Studien wurde angenommen, dass die Migration zum Ort der Ischämie nach Wochen stagniert (Kreuzberg *et al.*, 2010; Gotts und Chesselet, 2005; Hua *et al.*, 2008). Kuhn und Kollegen fanden jedoch heraus, dass die Migrationsreaktion bis zu einem Jahr nach dem ischämischen Ereignis persistiert (Kuhn *et al.*, 2011). Durch den Nachweis langanhaltender neuroregenerativer Vorgänge nach einem Schlaganfall erweitert sich das Zeitfenster für mögliche therapeutische Interventionen.

Der Einfluss pharmakologischer Therapien auf die Neurogenese wurde in mehreren Arbeiten untersucht. Neben zahlreichen Neurotrophinen, darunter BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), NGF (*nerv growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*) und primär nicht neuronalen Wachstumsfaktoren, wie z. B. G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), konnte gezeigt werden, dass auch Hormone, diverse Neurotransmitter und Pharmaka die Bildung neuer Nervenzellen modulieren, endogene Reparaturprozesse steigern und die funktionelle Regeneration verbessern (Neeper *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 1997; Cameron *et al.*, 1998; Brezun *et al.*, 1999; Eisch *et al.*, 2000; Malberg *et al.*, 2000; Gomez-Pinilla *et al.*, 2002; Santarelli *et al.*, 2003; Minnerup und Schäbitz, 2009).

### 1.1.7 Therapieempfehlungen

Eine spezifische pharmakologische Akuttherapie des Schlaganfalls kommt nur einem kleinen Teil der Patienten zugute (Minnerup *et al.*, 2011). Weitere evidenzbasierte Therapien umfassen die Versorgung der Patienten auf einer *Stroke Unit* mit Monitoring und Optimierung der vitalen Parameter, darüber hinaus die frühe Sekundärprophylaxe und die Behandlung von Komplikationen.

Im Folgenden soll näher auf die einzige spezifische Akuttherapie eingegangen werden. Das Prinzip ist die frühe Wiederherstellung des Blutflusses. Zur Auswahl stehen die intravenöse Thrombolysetherapie, die intraarterielle Thrombolysetherapie und die mechanische Rekanalisation des verschlossenen Gefäßes. Die Gabe von Thrombolytika

in der Frühphase des ischämischen Schlaganfalls basiert auf der Annahme, dass die frühzeitige Wiederherstellung der Zirkulation zum Erhalt reversibel geschädigter Neuronen führen kann. Innerhalb von 4,5 Stunden nach Auftreten der Symptome wird die Durchführung der systemischen intravenösen Lysetherapie mit rt-PA (*recombinant tissue plasminogen activator*) empfohlen (0,9 mg/kg KG, Maximum von 90 mg, 10 % der Gesamtdosis als Bolus, die restlichen 90 % im Anschluss als Infusion über 60 Minuten) (Hacke *et al.*, 2008). Liegt der Beginn der akuten Beschwerden zwischen 3 und 6 Stunden, kommt im Einzelfall die Auflösung des Blutgerinnsels durch eine arterielle Lysetherapie z. B. mit rt-PA in Frage (Diener *et al.*, 2004).

Der Einsatz der Thrombolysetherapie ist wegen der zahlreichen Kontraindikationen und des engen Zeitrahmens nicht immer möglich und auch nicht ungefährlich. Die Vorteile müssen dabei gegen mögliche Risiken, insbesondere das erhöhte Blutungsrisiko, abgewogen werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die mechanische Rekanalisation. Es wurde bereits eine Reihe mechanischer Rekanalisationsverfahren untersucht. Diese Maßnahmen umfassen akute chirurgische Eingriffe sowie vor allem neue mechanische endovaskuläre Verfahren der Gefäßwiedereröffnung mit speziellen Thrombektomiekathetern (Lasereinsatz, verschiedene Vorrichtungen zum Ansaugen oder Entfernen des Thrombus etc.) (Nogueira *et al.*, 2009). Ein sicherer Nutzen dieser Therapien konnte aber bis jetzt nicht belegt werden (Koh *et al.*, 2012).

Aufgrund der eingeschränkten Therapieoptionen in der akuten Phase eines ischämischen Schlaganfalls ist die Erforschung der Therapieoptionen in der subakuten Phase von großer Bedeutung.

## **1.2 Citicolin in der Therapie des Schlaganfalls**

### **1.2.1 Pharmakologie**

Citicolin (CDP-Cholin, Cytidin-5'-Diphosphocholin) wurde im Jahr 1956 durch Kennedy identifiziert (Kennedy, 1956). Es ist ein Nukleosiddiphosphat mit der Base Cytosin, die über einen Phosphorsäureester mit Cholin verknüpft ist. Citicolin ist eine natürlich vorkommende, körpereigene Verbindung und ein weit verbreiteter Bestandteil von

biologischen Membranen. Citicolin gehört in die Gruppe der Phosphoglyceride und ist ein Zwischenprodukt des Zellmembranstoffwechsels. Es wird als essenzieller Baustein für die Biosynthese von Zellmembran-Phospholipiden benötigt (Kennedy, 1956).

Citicolin ist eine wasserlösliche Verbindung mit mehr als 90 % Bioverfügbarkeit. Pharmakokinetische Studien zeigen, dass oral aufgenommenes Citicolin rasch resorbiert wird. In der Darmwand wird Citicolin durch Hydrolyse in Cholin und Cytidin zerlegt. Beide Bestandteile passieren die Blut-Hirn-Schranke und werden zu Citicolin resynthetisiert. Exogen zugeführtes Citicolin wird über zwei Wege ausgeschieden, zum einen respiratorisch über Kohlenstoffdioxid, zum anderen wird es renal eliminiert (Rao *et al.*, 1999).

Als wichtiger Bestandteil im Gehirnstoffwechsel ist Citicolin für die adäquate Funktion von Membranen und deren Reparatur entscheidend und zählt zu den wichtigsten Phospholipiden des Gehirns (Schäbitz *et al.*, 1996).

### **1.2.2 Wirkmechanismen von Citicolin in der Schlaganfallbehandlung**

Ein wichtiger und in mehreren Arbeiten gezeigter Mechanismus ist die neuroprotektive Wirkung von Citicolin (Adibhatla *et al.*, 2006; D'Orlando and Sandage, 1995). Dieser neuroprotektiven Wirkung liegen verschiedene Mechanismen zugrunde. Unter physiologischen Umständen katalysiert das Enzym Cholinphosphotransferase die Reaktion des Citicolins mit Diacylglycerin, wobei Phosphatidylcholin und Cytidin-5'-Monophosphat (CMP) entstehen (Agut *et al.*, 1983). Nach einem ischämischen Ereignis sind die phosphatidyl-abbauenden Enzyme aktiviert und die Cholinphosphotransferase gehemmt. Somit wird weniger Diacylglycerin in CMP und Phosphatidylcholin umgewandelt. Diacylglycerine kumulieren in der Zelle und werden zu freien Fettsäuren umgebaut, die wiederum zu oxygenierten Metaboliten umgewandelt werden. Diese Prozesse sind an dem ischämie-assoziierten Ödem und an der Entzündung beteiligt (Adibhatla *et al.*, 2001; Adibhatla *et al.*, 2006). Durch die exogene Zufuhr von Citicolin wird die Cholinphosphotransferasereaktion wieder hergestellt und dadurch die Bildung und Freisetzung der freien Fettsäuren verhindert (Adibhatla *et al.*, 2001; Adibhatla *et al.*, 2006; D'Orlando and Sandage, 1995). Zusätzlich kommt es nach einer zerebralen Ischämie aufgrund übermäßiger neuronaler Stimulation durch Acetylcholinfreisetzung zu

einer Cholinerschöpfung. Das exogen zugeführte Citicolin bietet Cholin für die Acetylcholin-Synthese. Dadurch kann in cholinergen Neuronen die Apoptose verhindert werden und es werden vermehrt Phosphatidylcholine zur Membranstabilisierung und -wiederherstellung gebildet (Yen *et al.*, 1999). Es gibt Hinweise, dass Citicolin über ähnliche Mechanismen auch bei der Aufrechterhaltung der Sphingomyelin- und Cardiolipinspiegel wirkt (Adibhatla *et al.*, 2001; Adibhatla *et al.*, 2006; Adibhatla und Hatcher, 2002; Adibhatla und Hatcher, 2002; Rao *et al.*, 2001).

Zusätzlich stabilisiert Citicolin die so genannten *Lipid Rafts*, die Glutamatttransporterproteine tragen, wodurch die Entfernung des excitatorischen Neurotransmitters Glutamat aus dem synaptischen Spalt gesteigert wird (Hurtado *et al.*, 2008).

Der in den tierexperimentellen Modellen nachgewiesene neuroprotektive Effekt von Citicolin hat sich in mehreren klinischen Studien bestätigt (Grieb *et al.*, 2001; D'Orlando und Sandage, 1995; Schäbitz *et al.*, 1996; Schäbitz *et al.*, 1999; Onal *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1998; Shuaib *et al.*, 2000; Adibhatla and Hatcher, 2002; Adibhatla und Hatcher, 2005). Die Wirkung wurde in den klinischen Studien an mehr als 11.000 Patienten und Probanden untersucht, wobei die experimentellen Daten eine ausgezeichnete Sicherheit des Medikamentes zeigten (Labiche and Grotta, 2004).

In den tierexperimentellen Studien fiel auf, dass Citicolin auch eine Wirkung in einem therapeutischen Fenster bis zu 24 Stunden zeigt (Martinez-Vila und Irimia, 2005). Außerdem sind in der klinischen Praxis auch Wochen und Monate nach dem ischämischen Ereignis verschiedene Grade der funktionellen Erholung beobachtet worden. Dies wird mit endogenen Reparaturmechanismen in Verbindung gebracht und deutet auf eine neuroregenerative Wirkung von Citicolin hin (Martinez-Vila und Irimia, 2005). Während die Wirkung der akuten Citicolin-Therapie nach einem ischämischen Insult auf die neuroprotektiven Mechanismen durch zahlreiche Studien gut belegt ist, sind mögliche Wirkungen einer Therapie auf neuroregenerative Mechanismen noch weitgehend unbekannt (Saver, 2008). Bekannt ist, dass Citicolin eine wichtige Rolle beim Aufbau der Zellmembranen spielt. Es bewirkt die beschleunigte Synthese von Membranphospholipiden, um die erhöhte Nachfrage zu decken. Man geht davon aus, dass der erhöhte Bedarf in dem subakuten Zeitraum nach einem Schlaganfall entsteht, um die Neuroregeneration, axonale Sprossung und die Synaptogenese zu unterstützen (Saver,

2008; Hurtado *et al.*, 2007; Martinez-Villa und Irimia, 2005; D'Orlando und Sandage, 1995). So fanden Hurtado und Kollegen heraus, dass die Behandlung mit Citicolin 24 Stunden nach dem ischämischen Ereignis neben der Förderung der funktionellen Erholung auch die neuronale Plastizität verbessert (Hurtado *et al.*, 2007).

Derzeit ist Citicolin in Deutschland als diätetisches Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke zugelassen (Davalos *et al.*, 2002; Minnerup und Schäbitz, 2009).

### **1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Die Kenntnisse über molekulare und biochemische Prozesse während und in Folge eines ischämischen Insults sind in den letzten Jahren gewachsen. Dennoch sind die Möglichkeiten zur Behandlung einer zerebralen Ischämie limitiert. Die zurzeit einzige verfügbare, kausale Therapie des ischämischen Schlaganfalls ist die unverzügliche Rekanalisation, von der jedoch nur ca. 5-10 % aller Patienten aufgrund des schmalen Zeitfensters und der Kontraindikationen profitieren (Minnerup *et al.*, 2011).

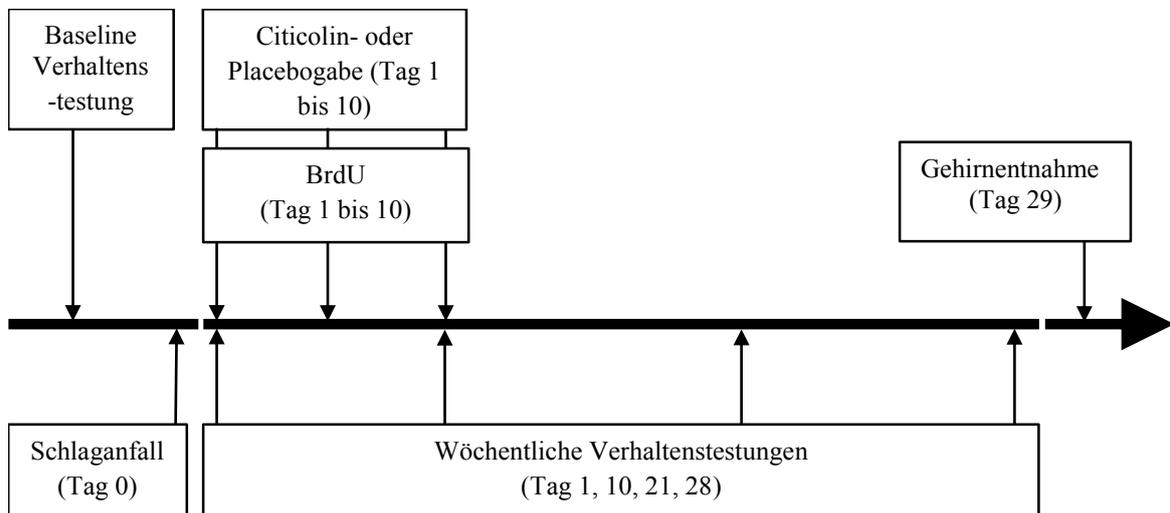
In experimentellen Schlaganfallstudien erwies sich Citicolin als besonders aussichtsreich, weil es neben einer neuroprotektiven Wirkung auch neuroregenerative Effekte hat (Hurtado *et al.*, 2007; Salver, 2008). Zudem gibt es Hinweise für eine Wirksamkeit von Citicolin in klinischen Schlaganfallstudien - zumindest für bestimmte Subgruppen von Schlaganfallpatienten (ICTUS-Studie) (Davalos *et al.*, 2012). Dennoch sind, insbesondere die der verbesserten funktionellen Regeneration zugrundeliegenden Mechanismen nicht genau verstanden.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- 1) Die Untersuchung der Wirksamkeit von Citicolin bezüglich der Regeneration auf Verhaltensebene.
- 2) Die Untersuchung des Einflusses von Citicolin auf die endogene Neurogenese als einen potentiellen Wirkmechanismus.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Versuchsablauf



**Abbildung 2-1: Übersicht über den zeitlichen Versuchsablauf**

Bei insgesamt 40 Tieren wurde eine Ischämie induziert. Zur Induktion des ischämischen Insults wurde das Modell der Fotothrombose verwendet. Siebzehn Tiere erhielten Citicolin, weitere siebzehn Tiere erhielten täglich für 10 Tage NaCl-Lösung. Die funktionelle Erholung nach dem Infarkt wurde mittels Zylindertest, Rotarod-Test und *Adhesive tape removal* Test erfasst. Nach vier Wochen erfolgte die Gehirnentnahme zur histologischen Analyse morphologischer Unterschiede mittels Toluidin-, BrdU/NeuN- und DCX-Färbungen.

### 2.2 Versuchstiere

Die Experimente wurden an erwachsenen männlichen Wistar Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 180 bis 200 Gramm durchgeführt. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit europäischen Richtlinien (*European Communities Council Directive* aus dem Jahr 1989) durchgeführt und durch die örtliche Ethikkommission genehmigt. Die Tierhaltung und die Durchführung der Tierversuche

fanden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Medizinischen Fakultät Münster statt. Die Tiere wurden zufällig paarweise eine Woche vor dem Operationsdatum in Käfige gesetzt. Die Käfige enthielten Holzgranulat und wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen (Raumtemperatur bis 22 Grad Celsius, einem 12-stündigem Hell-Dunkel Wechsel, Luftfeuchtigkeit von 50-60 %) gelagert. Die Tiere hatten freien Zugang zu Standardfutter (Altromin 1324, Lage, Deutschland) und zu Leitungswasser.

An den Tagen der Verhaltenstests wurden die Tiere gewogen. Hierdurch war eine Aussage über das Fressverhalten und somit über das Allgemeinbefinden der Tiere möglich.

Bei den Verhaltenstests und bei den histologischen Untersuchungen war der Untersucher bezüglich der Therapiegruppen verblindet. Die Gruppenzuteilung erfolgte randomisiert.

### **2.3 Wahl des Versuchsmodells**

Ein Schlaganfalltiermodell sollte folgende Kriterien erfüllen:

1. Die Läsion im Tiermodell sollte mit der Verletzung im menschlichen Gehirn vergleichbar sein.
2. Der pathologische und klinische Verlauf beim Tier sollte dem des Menschen ähneln.
3. Der operative Eingriff sollte bei jedem Tier reproduzierbare Läsionen verursachen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell für die fokale zerebrale Ischämie, das Fotothrombosemodell der Ratte, gewählt. Dieses Modell eignet sich besonders gut, um neuroregenerative Prozesse zu untersuchen (Watson *et al.*, 1985). Die Tiere haben milde neurologische Ausfälle, können früh Verhaltenstests unterzogen werden und weisen eine niedrige Mortalität auf.

Beim Modell der Fotothrombose wird den Ratten eine fotosensitive Substanz (Bengalrosa) intravenös verabreicht. Durch gezielte Bestrahlung mit Licht von 560 nm Wellenlänge wird ein Endothelschaden in kortikalen Gefäßen hervorgerufen, es entsteht eine Thrombozytenaggregation gefolgt von einer umschriebenen Ischämie (Watson *et al.*, 1985).

In der Schlaganfallforschung ermöglichen histologische Untersuchungen den Nachweis der Neubildung von Nervenzellen. In der Klinik stellt aber die neurologische Funktionsverbesserung den wichtigsten Faktor für die Beurteilung des Therapieerfolges dar. Aus diesem Grund ist es bedeutsam, neben histologischen Ergebnissen, auch die funktionelle Erholung mittels Verhaltenstests in die Auswertung einzubeziehen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass Nager ein hohes Maß an spontaner funktioneller Erholung aufweisen (DeVries *et al.*, 2001). Aus diesem Grund werden an Verhaltenstests in der Schlaganfallforschung hohe Anforderungen gestellt. Einerseits müssen die Verhaltenstests Veränderungen direkt nach der Operation zuverlässig anzeigen und andererseits Aussagen über die Langzeitfunktionsverbesserung ermöglichen. In dieser Arbeit wurden die Tiere vor und nach der Operation etablierten Verhaltenstests unterzogen, um sensomotorische Fähigkeiten zu erfassen.

## **2.4 Fotothrombotischer Schlaganfall**

### **2.4.1 Narkose**

Der Eingriff hatte das Ziel, durch Fotothrombose eine ischämische Läsion zu erzeugen. Die Narkose bei den Versuchstieren wurde durch eine intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (8 mg/kg Körpergewicht) eingeleitet.

### **2.4.2 Intraoperative Lagerung**

Bei ausreichend tiefer Narkose wurde das Tier in der Leistenregion rasiert. Danach wurde das Tier mittels Klebestreifen auf dem Rücken liegend auf einem Temperaturregelsystem fixiert. Zur Überprüfung der Körpertemperatur wurde eine rektale Sonde gelegt. Die Körpertemperatur des Tieres wurde bei 37-37,5 Grad Celsius konstant gehalten.

Um die Augen des Tieres vor Austrocknung zu schützen wurde Bepanthen Salbe (Bayer Vital GmbH) aufgetragen.

### **2.4.3 Einsetzen eines Katheters in die *Vena femoralis***

Nach Hautdesinfektion und Abdecken der linken Leiste des Versuchstieres erfolgte ein ca. ein Zentimeter langer Hautschnitt. Es folgte die Präparation des subkutanen Fett- und Bindegewebes, sowie die schonende Darstellung der Femoralgefäße. Nach der Eröffnung der *Vena femoralis* wurde ein Polyethylenkatheter (*Fine Bore Polythene Tubing*, Innendurchmesser 0,58 mm, Außendurchmesser 0,96 mm) 2-3 cm in die Vene vorgeschoben und mit Fäden befestigt.

### **2.4.4 Präparation der Kalotte**

Nach stereotaktischer Fixierung des Schädels und Hautdesinfektion erfolgte ein sagittaler Hautschnitt in der Mittellinie von 3 cm Länge. Anschließend wurde das Bregma dargestellt und stereotaktisch ein Punkt 0,5 mm ventral des Bregmas und 3,5 mm seitlich der Mittellinie markiert.

### **2.4.5 Induktion der ischämischen Läsion**

Der Zielpunkt wurde mit einem Laserspot (8 mm Durchmesser, G Laser Technologies) für 20 Minuten beleuchtet. Über die ersten 2 Minuten der Belichtung wurde 0,133 ml des Farbstoffes Bengalrosa pro Kilogramm Körpergewicht über den Femoralvenenkatheter intravenös injiziert. So wurde eine fotochemische Ischämie im rechten parietalen Kortex erzeugt. Der Hautverschluss erfolgte mittels eines nicht resorbierbaren, monofilen chirurgischen Nahtmaterials (4-0 Prolene). Unter kontinuierlicher Temperaturkontrolle erwachten die Tiere aus der Narkose. Die Tiere wurden anschließend paarweise in ihre Käfige zurückgesetzt.

Während der Operation starben 6 Tiere.

## **2.5 Therapie**

Für die Therapie wurden die Tiere den Untersuchungsgruppen randomisiert zugeteilt: Gruppe A (Kontrollgruppe, n = 17): Ischämie, Behandlung mit 0,5 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung intraperitoneal (i.p.), Behandlungsbeginn 24 h nach Ischämie.

Gruppe B (Therapiegruppe, n = 17): Ischämie, Behandlung mit 100 mg/kg Citicolin gelöst in 0,5 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung i.p., Behandlungsbeginn 24 h nach Ischämie. Die Tiere wurden an zehn hintereinander folgenden Tagen mit Citicolin bzw. NaCl behandelt. Die Injektion erfolgte unter Fixierung des Tieres in Rückenlage. Es wurde darauf geachtet, dass der Kopf des Tieres etwas tiefer gehalten wird, damit das Darmkonvolut nach kranial rutschen konnte und somit beim Einstechen der Nadel in die Bauchhöhle nicht verletzt wurde. Verwendet wurde eine sterile Kanüle (BD Mikrolance 3, Nr. 18). Der Einstich erfolgte in dorsokranialer Richtung paramedian durch die Bauchdecke.

## 2.6 BrdU-Gabe

Für die *in vivo*-Markierung der Stammzellen wurde den Tieren beider Gruppen 50 mg/kg/Tag BrdU i.p. eine Stunde vor Injektion der NaCl-Lösung bzw. vor Injektion von Citicolin verabreicht. Die BrdU-Lösung wurde täglich direkt vor der Applikation frisch hergestellt. Dazu wird die abgemessene sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung im Wasserbad auf 37 Grad Celsius erwärmt und das abgewogene, tiefgekühlte BrdU-Pulver darin über 15 min auf dem Rotationsschüttler gelöst.

## 2.7 Sensomotorische Verhaltenstests

Es wurden drei Verhaltenstests, der Zylindertest, der Rotarod-Test und der *Adhesive tape removal* Test durchgeführt. Die Tests wurden nach einem festen Zeitplan im Verhaltenslabor durchgeführt, dessen Fenster mit lichtundurchlässiger Folie abgeklebt wurden. Dadurch konnten Umwelteinflüsse wie Witterung und Lichteinfall eliminiert werden. Die Reihenfolge der Tests pro Versuchungstag wurde beibehalten. Die Tageszeit des Testens pro Tier blieb gleich (+/- 1Stunde), so dass tageszeitliche Einflüsse auf das Verhalten minimiert werden konnten.

Vor der Testung wurden die Tiere an den Untersucher, die Testsituation und die Testapparatur gewöhnt. An drei aufeinander folgenden Tagen vor der Ischämieinduktion wurden die Tiere jeweils einmal täglich für den Rotarod-Test und den *Adhesive tape removal* Test trainiert. Ein Tag vor der Ischämieinduktion wurde eine sogenannte

Baseline-Testung durchgeführt. Diese beinhaltete neben Rotarod-Test und *Adhesive tape removal* Test auch den Zylindertest. Zusätzlich wurden die Tiere im Rahmen der Baseline-Testung gewogen. Die weiteren Testungen wurden an den Tagen 1, 10, 21 und 28 nach der Ischämie vorgenommen. Die Durchführung der Verhaltenstests erfolgte durch einen für die Gruppeneinteilung verblindeten Untersucher. Nach vier Wochen wurden die Tiere getötet und die Gehirne entnommen.

### **2.7.1 Rotarod-Test**

Im Rotarod-Test wurden Motorik und Koordinationsfähigkeit während einer Laufleistung getestet (Abb. 2-2) (Jones und Roberts, 1968). Die Versuchstiere liefen auf einer Walze, die sich um eine horizontale Achse drehte. Diese Walze war durch Plastikscheiben in verschiedene Bereiche abgetrennt. Die Geschwindigkeit der Umdrehung wurde konstant über einen Zeitraum von 5 Minuten von 4 auf 40 Umdrehungen pro Minute erhöht. Die Schwierigkeit für die Tiere bestand darin, ihre Laufgeschwindigkeit mit der Umdrehungsgeschwindigkeit der Walze zu beschleunigen. Sobald die Tiere von der Walze herunterfielen und den Boden berührten, wurde ein Mechanismus ausgelöst, der die Zeitmessung anhielt und die individuelle Messung somit beendete. Als Untersuchungsparameter diente die durchschnittlich auf dem Rotarod verbrachte Laufzeit. Es wurden an den jeweiligen Testterminen pro Tier drei Messungen durchgeführt. Das Ergebnis wurde gemittelt und als Testwert dokumentiert.



**Abbildung 2-2:** Rotarod-Test. Die Versuchstiere laufen auf einer Walze, die sich um horizontale Achse dreht. Es wird die durchschnittliche Laufzeit gemessen.

### 2.7.2 *Adhesive tape removal Test*

Der *Adhesive tape removal Test* (Abb. 2-3) ist ein sensibler Test, um sowohl sensorische als auch feinmotorische Funktionen zu messen (Schallert *et al.*, 1982). Bei diesem Test wurde je ein runder Aufkleber mit einem Durchmesser von 1 cm auf den proximalen Teil der Innenflächen beider Vorderpfoten (rechts und links) aufgeklebt. Als maximal tolerierte Dauer eines Durchlaufs wurde eine Zeitspanne von 120 Sekunden definiert. Es wurde die Zeit gemessen, die das Versuchstier benötigte um die Aufkleber von den Pfoten zu entfernen und daraus der seitengetrennte Mittelwert für jede Pfote berechnet. Aus den Mittelwerten beider Seiten wurde dann ein Asymmetrie Score nach der folgenden Formel berechnet: (Zeit bis zum Entfernen des Aufklebers der ipsilateralen Pfote minus die Zeit

bis zum Entfernen des Aufklebers der kontralateralen Pfote) / (Zeit bis zum Entfernen des Aufklebers der kontralateralen Pfote plus die Zeit bis zum Entfernen des Aufklebers der ipsilateralen Pfote).



**Abbildung 2-3:** *Adhesive tape removal* Test. Hier wird die Zeit gemessen, die das Versuchstier braucht, um die Aufkleber von den Pfoten zu entfernen.

### 2.7.3 Zylindertest

Der Zylindertest (Abb. 2-4) wurde von Schallert und Kollegen entwickelt und ist ein sensitiver Test, um motorische Asymmetrien der Tiere während der Umgebungserkundung zu untersuchen (Schallert *et al.*, 1982). Bei dem Test wurde ein Tier in einen Glaszylinder (Durchmesser von 16 cm, Höhe von 20 cm) gesetzt. Die zylindrische Form begünstigt insbesondere vertikale Erkundungen an der Wand unter Zuhilfenahme der Vorderpfoten. Der Zylinder stand auf einem Glastisch von 72 cm Höhe. Während des Tests wurde das Tier durch eine Videokamera gefilmt, die sich unter dem Tisch befand. Nach dem das Tier in den Zylinder gesetzt wurde, dokumentierte die Kamera das Verhalten des Versuchstieres über einen Zeitraum von drei Minuten.

Beurteilt wurden die Berührung der Zylinderwand und des Zylinderbodens mit den Vorderpfoten. Angewendet wurde das folgende Beurteilungsschema: Jeder Kontakt der Vorderpfote mit der Wand oder dem Boden wurde als unabhängige Wandberührung gezählt.



**Abbildung 2-4:** Zylindertest. Beurteilt wurde die Asymmetrie bei der Berührung der Zylinderwand und des Zylinderbodens mit den Vorderpfoten.

Alle Videoaufnahmen wurden durchgesehen und ausgewertet. Dafür wurde seitengetreunt gezählt, wie häufig das Versuchstier jeweils mit rechter bzw. linker Vorderpfote den Zylinderboden bzw. die Zylinderwand berührt hat. Aus diesen Werten wurde ein Verhältnis gemäß der folgenden Formel ermittelt: (Berührung der Wand und des Bodens mit der kontralateralen Vorderpfote minus Berührung der Wand und des Bodens mit der ipsilateralen Vorderpfote) / (Berührung der Wand und des Bodens mit der kontralateralen Vorderpfote plus Berührung der Wand und des Bodens mit der ipsilateralen Vorderpfote).

## 2.8 Histologische Untersuchungen

### 2.8.1 Allgemeines Vorgehen

Für die histologischen Arbeiten wurden die Gehirne von 7 Tieren der Kontroll- und von 7 Tieren der Therapiegruppe verwendet. Die Gehirne der restlichen Tiere wurden für die *in vitro*-Rezeptorautoradiographie verwendet, die nicht Gegenstand dieser Arbeit ist.

Nach Beendigung der postoperativen Therapie und der sensomotorischen Verhaltenstests wurden die Tiere am Tag 29 erneut anästhesiert und anschließend perfundiert. Dafür wurden die Tiere thorakotomiert, das Perikard eröffnet und eine Knopfkanüle über die Herzspitze bis in die *Aorta ascendens* vorgeschoben. Nach der Fixierung der Knopfkanüle wurde das rechte Herzhorn eröffnet. Gleichzeitig wurde über die Knopfkanüle das Gefäßsystem über einen Zeitraum von 10 Minuten mit 0,9 %iger NaCl Lösung durchgespült, um das Blut gegen NaCl-Lösung auszutauschen. Im Anschluss wurde über die Kanüle 4 % PFA (Paraformaldehyd) in 0,1 mol/L Phosphatpuffer infundiert, um das Gehirngewebe zu fixieren.

Nach Kraniotomie und Entnahme der Gehirne wurden diese über Nacht in 4 %iger PFA-Lösung bei 4 Grad Celsius gelagert. Anschließend wurden die Gehirne für 3 Tage in 30 %ige Sucrose-Lösung gegeben, dann auf Trockeneis gefroren und bei -80 Grad Celsius gelagert.

Als Nächstes wurden mit Hilfe eines Cryostaten 20 µm dicke Schnitte erstellt. Ein Teil der Schnitte wurden direkt auf gläserne Objektträger aufgezogen, der andere Teil in *Tissue cryoprotectant solution* (TCS) gelagert.

Alle histologischen Analysen erfolgten durch einen Untersucher, der für die Gruppenzuteilung verblindet war.

### 2.8.2 Toluidinfärbung

Die Färbung der Präparate erfolgte mit Toluidinblau. Die basische Toluidinfärbung ist eine unspezifische histochemische Färbung und eignet sich gut als Übersichtsfärbung. Sie zeichnet sich durch ihre Einfachheit und gute Standardisierung aus. Sie wurde durchgeführt, um die Infarkt volumina der Versuchstiere zu quantifizieren. Die Färbung wurde an aufgezogenen Schnitten an einem Tag durchgeführt.

Vorgehen :

- Trocknung der Schnitte für 20 Minuten bei Zimmertemperatur
- Waschen in phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) 3 Mal für 5 Minuten
- Färbung mit gefilterter 0,7 % Toluidinlösung für 10 Minuten
- Waschen mit Aqua dest. 3 Mal für 1 Minute
- Differenzierung mit 70 % Alkohol für 2 Minuten
- Differenzierung mit 90 % Alkohol für 1 Minute
- Zugabe von Histoclear für 1 Minute
- Trocknung bei Zimmertemperatur
- Eindeckeln mit Roti Histofix

### **2.8.2.1 Auswertung der Toluidinfärbung**

Die Auswertung aller immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop eclipse 80i von Nikon. Die mit Toluidinblau gefärbten Schnitte wurden in 10facher Vergrößerung mit der digitalen CoolSNAP-Kamera (*Roper Scientific, Fotometrics, CoolSNAP™* cf, Ottobrunn/ München, Deutschland) fotografiert. Die digitalisierten Photographien der Schnitte wurden in das Computerprogramm MCID image analysis software (*Imaging Research Inc., St Catharines, Ontario, Canada*) übertragen und ausgewertet. Dafür wurde zunächst die Infarktfläche aller Schnitte eines Versuchstiers ermittelt. Aus der Infarktfläche wurde dann das Infarktvolumen berechnet (Infarktfläche x Anzahl der Schnitte x Schnittdicke x Schnittintervall).

### **2.8.3 BrdU/NeuN-Färbung**

BrdU (Bromodeoxyuridin) ist ein synthetisches Thymidinanalogon und dient dem Nachweis mitotisch aktiver Zellen (Kuhn *et al.*, 2007). Während der Zellteilung wird die Erbinformation in Form der DNS dupliziert. Der DNS-Doppelstrang wird dafür aufgebrochen wobei sich die Nukleotide an die freien Bindungsstellen beider Einzelstränge anlegen. Es werden zwei neue DNS-Doppelstränge gebildet. Injiziert man nun dem lebenden Versuchsobjekt das BrdU, so tritt BrdU in Konkurrenz mit Thymidin und paart sich mit Adenin. Durch die immunhistochemische BrdU-Färbung soll die

Gesamtzahl aller neu gebildeten Zellen dargestellt werden, die sich während der *in vivo*-Markierung mit BrdU, also im Zeitraum von Tag 1 bis Tag 10 nach der Ischämie, neu gebildet haben. Bei der Färbung bindet ein primärer monoklonaler Antikörper an BrdU unter Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Mithilfe eines sekundären Antikörpers, einer enzymatischen Reaktion und eines Farbstoffes können die Antigen-Antikörperkomplexe sichtbar gemacht werden (Kuhn *et al.*, 2007; Gould *et al.*, 1999; Kornack *et al.*, 1999; Eriksson *et al.*, 1999).

Zur Detektion der Neurogenese wird eine Doppelfärbung mit dem neuronalen Marker NeuN und dem BrdU durchgeführt, um die Anzahl und den Phänotyp der neu entstandenen Zellen zu bestimmen.

Der NeuN-Antikörper bindet an das neuronenspezifische Protein NeuN, welches sich in den meisten neuronalen Zelltypen des ZNS und PNS finden lässt. Die Distribution dieses Proteins beschränkt sich auf den neuronalen Kern, die Perikarya und einige proximale neuronale Fortsätze sowohl im fetalen als auch im erwachsenen Gehirn (von Bohlen, 2007). Immunhistochemisch detektierbares NeuN-Protein lässt sich in der postmitotischen Phase der Neuronen nachweisen (von Bohlen, 2007). Die Schnitte wurden einem Fluoreszenzmarker für NeuN ausgesetzt. Diese Marker besitzen sekundäre Antikörper, die durch unterschiedliche Wellenlängen angeregt werden, was mittels eines Fluoreszenzmikroskopes dargestellt werden kann. Mit dieser Färbung wurde der prozentuale Anteil an Neuronen bezogen auf alle neugebildeten Zellen bestimmt.

Vorgehen:

Tag 1:

- Waschen in phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) 3 Mal für 5 Minuten
- Denaturierung der DNS:
  - 50 % Formamide / 2 Mal SSC 2 Stunden bei 60 Grad Celsius
  - 2 Mal SSC 2 Mal 5 Minuten bei 60 Grad Celsius
  - 2 N HCl 30 Minuten bei 60 Grad Celsius
- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Vorbehandlung mit 0,1 M Borate Puffer, pH 8,5
- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Blocken mit Blocking Reagenz (BR I) für 30 Minuten

- Zugabe des 1. Antikörpers RBrdU in BR I (Verhältnis 1:500) bei 4 Grad Celsius über Nacht

Tag 2:

- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Zugabe von BgaR in BR (Verhältnis 1:500) für 1 Stunde
- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Zugabe von Farbstoff A594 in BR I (Verhältnis 1:500) für 1 Stunde (Nach Zugabe des Farbstoffs müssen die weiteren Schritte abgedunkelt durchgeführt werden)
- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Zugabe des 2. Antikörpers NeuN in BR I (Verhältnis 1:200) bei 4 Grad Celsius über Nacht

Tag 3:

- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Zugabe von 488GaM in BR I (Verhältnis 1:200) für 1 Stunde
- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten

Es erfolgte ein Aufziehen der Schnitte auf Objektträger. Als Eindeckmedium wurde Mounting Medium mit DAPI verwendet. DAPI wurde für die unspezifische Färbung aller Zellkerne benutzt und ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an die adenosin- und thymidinreiche Abschnitte der DNS anlagert (Kapuscinski, 1995).

SSC:

800 ml Wasser

17,5 g NaCl

8,82 g Natriumcitrat

auf 1 L mit Wasser auffüllen

pH 7,0

Blocking Reagenz:

12 ml PBS

120  $\mu$ L 10 % Triton X

480  $\mu$ L Goat Serum

Borat Puffer 0,1 M:

3,8 g Natriumborat MW 381

100 ml Aqua dest.

pH 8,5

### **2.8.3.1 Auswertung der BrdU/NeuN-Färbung:**

BrdU-positive Zellen wurden in der Subventrikulärzone und im *Gyrus dentatus* des Hippokampus beider Hemisphären untersucht. Dafür wurden BrdU-positive Zellen manuell gezählt. Um den Anteil der Neuronen unter den BrdU-positiven Zellen zu ermitteln, wurden 20 zufällig ausgewählte BrdU-positive Zellen auf ihre Positivität auf NeuN untersucht. Dann wurde die Gesamtanzahl BrdU-positiver Zellen mit dem prozentualen Anteil von NeuN/BrdU-doppelpositiven Zellen multipliziert, um die Zahl der neu entstandenen Neuronen zu ermitteln.

Die Ergebnisse der Zählungen aller histologischen Schnitte eines Versuchstieres wurden addiert. Aus den Zellzahlen der Tiere einer Gruppe wurde der Mittelwert errechnet.

### **2.8.4 DCX-Färbung**

*Doublecortin* (DCX) ist ein X-chromosomal kodiertes und Mikrotubulus-assoziiertes Protein, das während der Embryogenese des zentralen Nervensystems und während adulter Neurogenese von neuronalen Vorläuferzellen und in den Dendriten und Somata von differenzierten, unreifen Neuronen exprimiert wird (von Bohlen, 2007; Corbo *et al.*, 2002). DCX ist nur kurzfristig in neu entstandenen Neuronen nachweisbar und findet sich weder in unreifen Stammzellen, noch in adulten Neuronen. *Doublecortin* hat eine essentielle Funktion bei der Migration neuronaler Zellen und wird für die schichtenspezifische Positionierung der verschiedenen Zelltypen in der

Hippokampusrinde benötigt. Sein Expressionsmuster macht DCX zu einem gut geeigneten Marker für die Neurogenese (von Bohlen, 2007; Corbo *et al.*, 2002).

Tag 1:

- Waschen in PBS 3 Mal für 5 Minuten
- Blocken mit Blocking Reagenz BR II für 15 Minuten
- Zugabe des 1. Antikörpers (DCX) in BR (Verhältnis 1:500) bei 4 Grad Celsius über Nacht

Tag 2:

- Waschen in PBS 3 Mal für 5 Minuten
- Zugabe des 2. Antikörpers (BgoaRb) in BR II (Verhältnis 1:100) für 45 Minuten
- Waschen in PBS 3 Mal für 5 Minuten
- Zugabe des Farbstoffs AV 594/ AV 488 in BR II (Verhältnis 1:100) für 45 Minuten
  
- Blocking Reagenz II:
  - 1 % Lsg.
  - 1 Gramm Blocking Reagenz Donkey
  - 100 ml Maleinsäurepuffer
  - pH 7,5

Aufziehen der Schnitte auf Objektträger. Eindeckeln der Objektträger mit Mounting Medium mit DAPI.

#### **2.8.4.1 Auswertung der DCX-Färbung**

In der mikroskopischen Analyse dieser Färbung wurden zur neuronalen Differenzierung der neu gebildeten Zellen die DCX-positive Zellen in der Infarktregion gesucht.

Aus methodischen Gründen war die Quantifizierung der Zahl der neugeborenen Vorläuferzellen in der SVZ und im *Gyrus dentatus* nicht möglich, da sich einzelne Zellen kaum gegeneinander abgrenzen ließen.

## **2.9 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung der Verhaltenstests wurde die Software SPSS (Version 15.0 für Windows) verwendet und die Ergebnisse als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) wiedergegeben. Eine ANOVA mit Messwertwiederholungen wurde verwendet um die sensomotorischen Defizite zu analysieren. Bei oben genannten Signifikanztests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als Signifikanzniveau festgelegt.

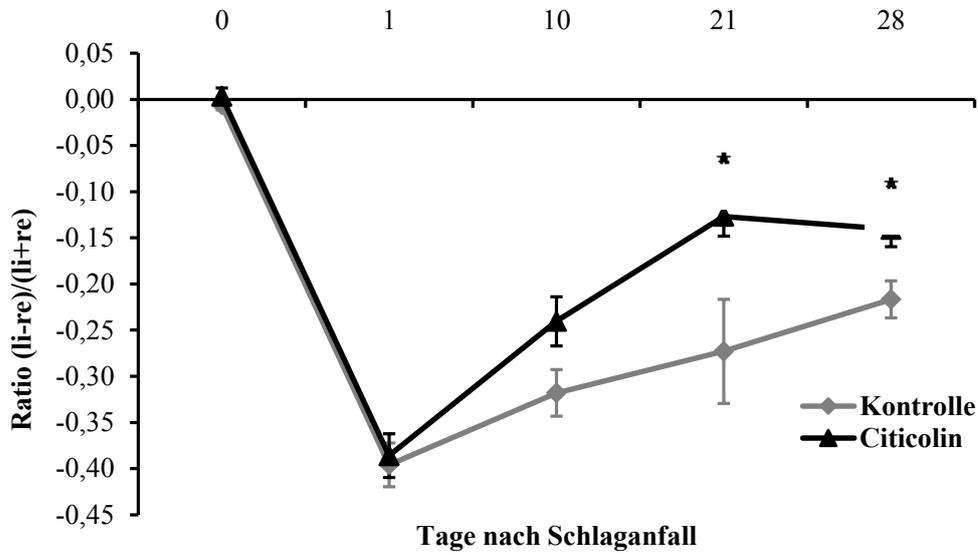
Die histologischen Daten der zwei experimentellen Gruppen wurden mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test verglichen. Die Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen erfolgte mittels Bonferroni-Korrektur.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der Verhaltenstests

#### 3.1.1 Zylindertest

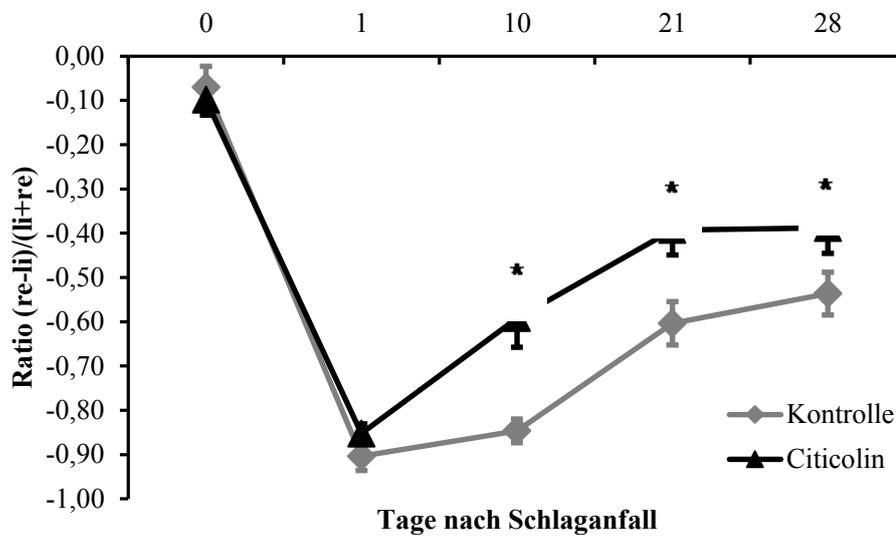
Mit dem Zylindertest wurde die funktionelle Erholung nach dem Infarkt erfasst. Vor der zerebralen Ischämie wurden in beiden Gruppen (Therapie- und Kontrollgruppe) beide Vorderpfoten etwa gleich häufig bei den Erkundungen im Glaszylinder eingesetzt (Abb. 3-1). Die post-ischämische Analyse zeigte Beeinträchtigungen in den Vorderpfotenbewegungen kontralateral zur Läsion in beiden experimentellen Gruppen und über den gesamten postoperativen Zeitraum hinweg. Generell wurde die beeinträchtigte Vorderpfote nach zerebraler Ischämie weniger gebraucht als die Gegenseite. Im postoperativen Verlauf konnte die Angleichung an die Werte vor der Ischämie in beiden Gruppen nicht erreicht werden. Es fiel aber auf, dass bei den mit Citicolin behandelten Tieren die initiale Beeinträchtigung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbessert wurde. Die berechnete ANOVA mit Messwertwiederholungen ergab signifikante Effekte für den Faktor Gruppe  $F(1,29)$ : 12,494;  $p < 0,05$  und für den Faktor Durchgang  $F(1,29)$ : 16,480;  $p < 0,05$ , jedoch nicht für die Interaktion Durchgang mit Behandlungsgruppe  $F(1,29)$ : 0,0001;  $p = 0,993$ .



**Abbildung 3-1:** Zylindertest. Die mit Citicolin behandelten Tiere zeigten eine signifikante Verbesserung der Regeneration im Vergleich zu Placebogruppe (MW $\pm$ SEM,  $p < 0,05$ , ANOVA).

### 3.1.2 Adhesive tape removal Test

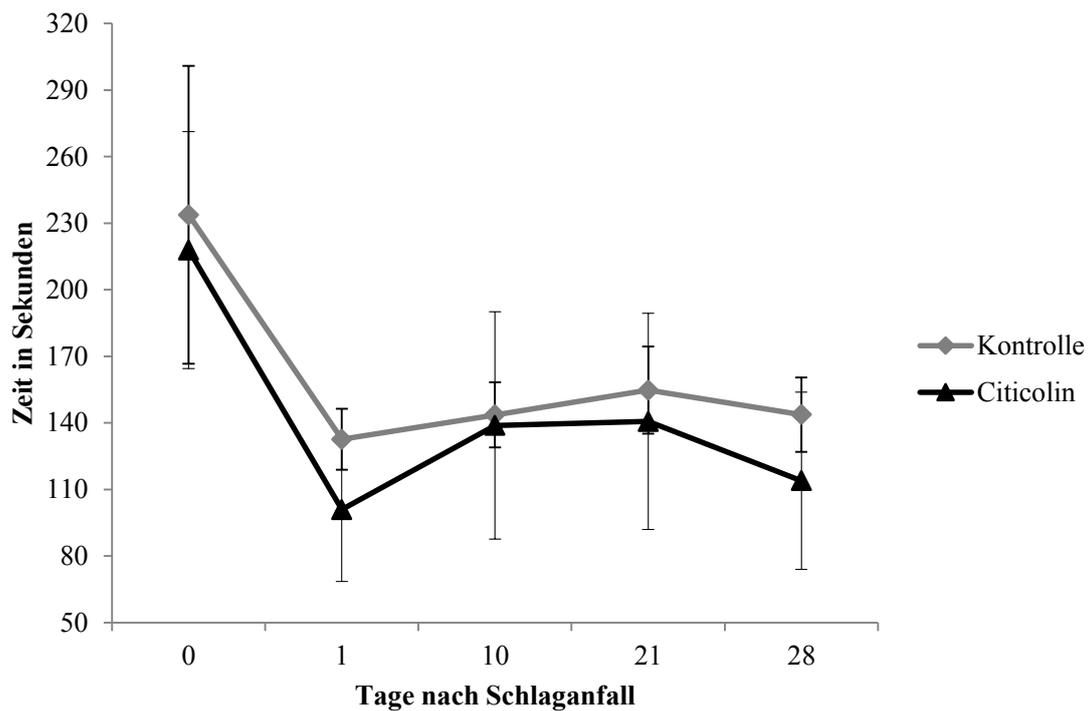
Nach dem Schlaganfall zeigten die Tiere der Therapiegruppe eine signifikant bessere funktionelle Erholung im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe (Abb. 3-2). Das sensomotorische Defizit verringerte sich über Wochen und hat in den letzten zwei Messungen eine deutliche Besserung erfahren. Eine ANOVA mit wiederholten Messungen ergab signifikante Effekte für den Faktor Gruppe  $F(1,32)$ : 12,769;  $p < 0,05$  und für den Faktor Durchgang  $F(1,32)$ : 51,548;  $p < 0,05$ , jedoch nicht für die Interaktion Durchgang mit Behandlungsgruppe  $F(1,32)$ : 2,167;  $p = 0,151$ .



**Abbildung 3-2:** *Adhesive tape removal* Test. Die Tiere der Therapiegruppe zeigten signifikant bessere funktionelle Erholung im Vergleich zu den Tieren der Placebogruppe (MW $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ , ANOVA).

### 3.1.3 Rotarod-Test

Der Einsatz des Rotarod erfolgte mit dem Ziel nach der Ischämie Defizite lokomotorischer Funktionen zwischen Therapie- und Kontrollgruppe zu untersuchen. Nach der Ischämie konnte eine Verschlechterung der Leistung in beiden Gruppen beobachtet werden (Abb. 3-3). Im postoperativen Verlauf besserten sich die Werte in beiden Gruppen, wobei der Ausgangswert nicht erreicht werden konnte. Die statistische Analyse ergab beim Vergleich der Gruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Therapiegruppe für die Faktoren Gruppe ( $p = 0,265$ ), Durchgang ( $p = 0,138$ ) und Interaktion mit Durchgang ( $p = 0,192$ ).



**Abbildung 3-3:** Rotarod-Test. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Placebo- und der Therapiegruppe festgestellt.

### 3.1.4 Körpergewicht

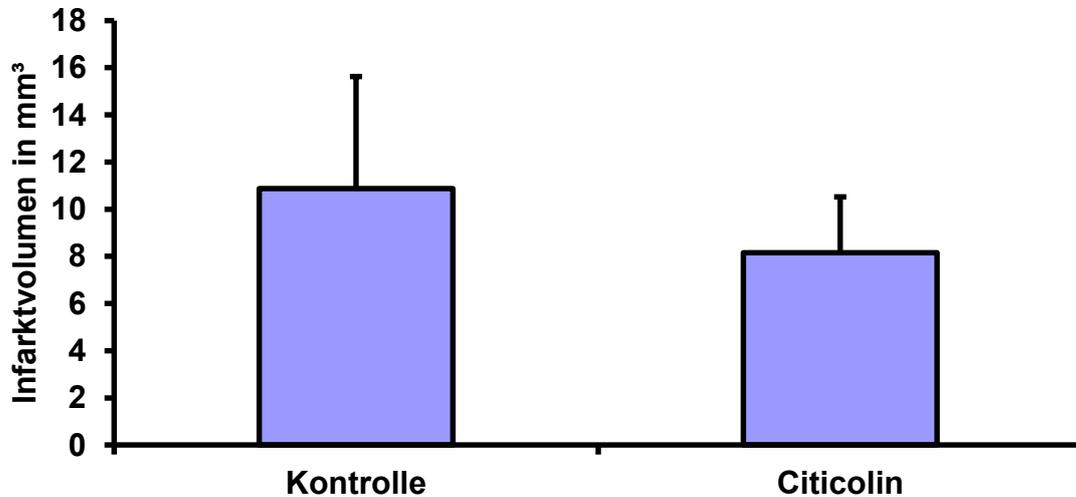
Der Gewichtsverlauf verlief in beiden Gruppen unterschiedlich. Im postoperativen Verlauf zeigten zwar die Tiere beider Gruppen eine Zunahme des Gewichts. Dies war jedoch in der Therapiegruppe signifikant stärker ausgeprägt ( $p < 0,05$ ). Die berechnete ANOVA mit Messwertwiederholungen ergab signifikante Effekte für den Faktor Gruppe  $F(1,33): 11,767; p < 0,05$ , Durchgang  $F(1,33): 868,830; p < 0,05$  und die Interaktion Durchgang mit Behandlungsgruppe  $F(1,33): 12,952; p < 0,05$ .

## 3.2 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

### 3.2.1 Toluidinfärbung

Mittels Toluidinfärbung wurde das Infarktvolumen ermittelt (Abb. 3-4). Der Mittelwert des Infarktvolumens der Tiere aus der Kontrollgruppe lag bei  $10,78 \pm 4,76 \text{ mm}^3$  und bei den Tieren der Therapiegruppe bei  $8,15 \pm 2,38 \text{ mm}^3$  ( $p = 0,154$ ). Damit unterschieden

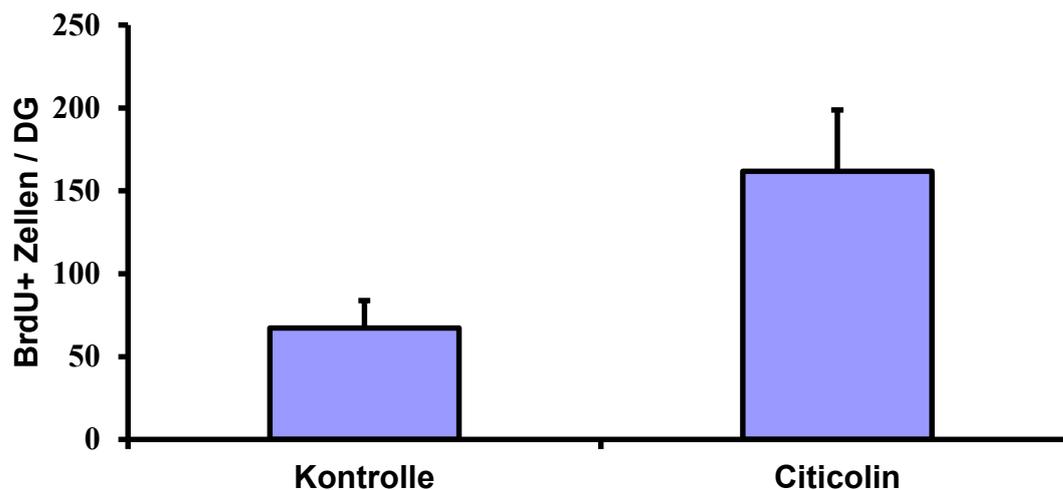
sich die berechneten Volumina der Infarkte in der Therapiegruppe nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe.



**Abbildung 3-4:** Effekte von Citicolin auf die Infarktvolumina in der Toluidinfärbung. In der Therapiegruppe ergab sich keine signifikante Reduktion des Infarktvolumens im Vergleich zu Kontrollgruppe ( $p = 0,154$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit  $p$ -Wert  $< 0,05$ .

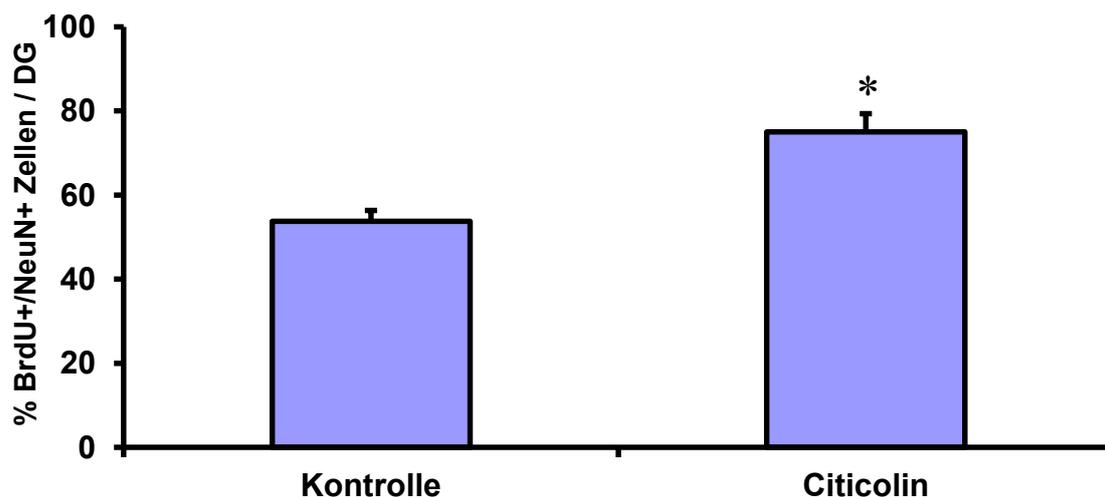
### 3.2.2 BrdU/NeuN-Färbung

Wie aus der Abbildung 3-5 ersichtlich ist, war die Anzahl der BrdU-positiven Zellen im Bereich des *Gyrus dentatus* des Hippokampus in der Therapiegruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Der Mittelwert der Zellzahl der mit BrdU markierten Kerne lag bei  $67,25 \pm 16,48$  in der Kontrollgruppe und bei  $161,07 \pm 36,96$  in der Therapiegruppe.



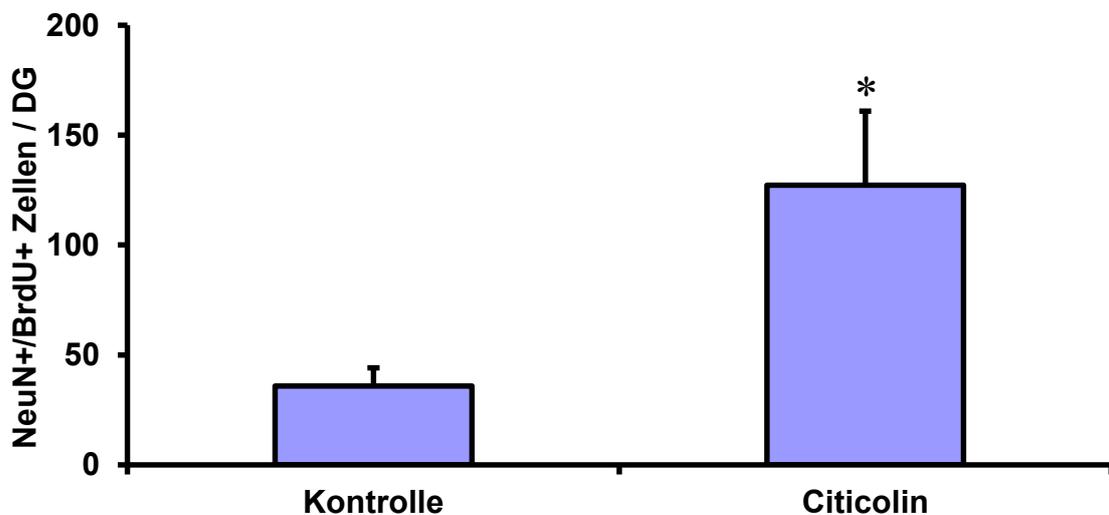
**Abbildung 3-5:** BrdU-Färbung im Bereich des *Gyrus dentatus*. Die Behandlung mit Citicolin führte zu signifikant höherer Zahl der BrdU-positiven Zellen im DG des Hippokampus ( $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit p-Wert  $< 0,05$ .

Im *Gyrus dentatus* lag der Mittelwert der doppelpositiven Zellen (der Zellen, die für BrdU und NeuN positiv sind) in der Kontrollgruppe bei  $53,75 \pm 2,63$  % und in der Therapiegruppe bei  $75,00 \pm 4,36$  %. Somit waren die BrdU-positiven Zellen in der Therapiegruppe zu signifikant höherem Anteil Neuronen als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3-6).



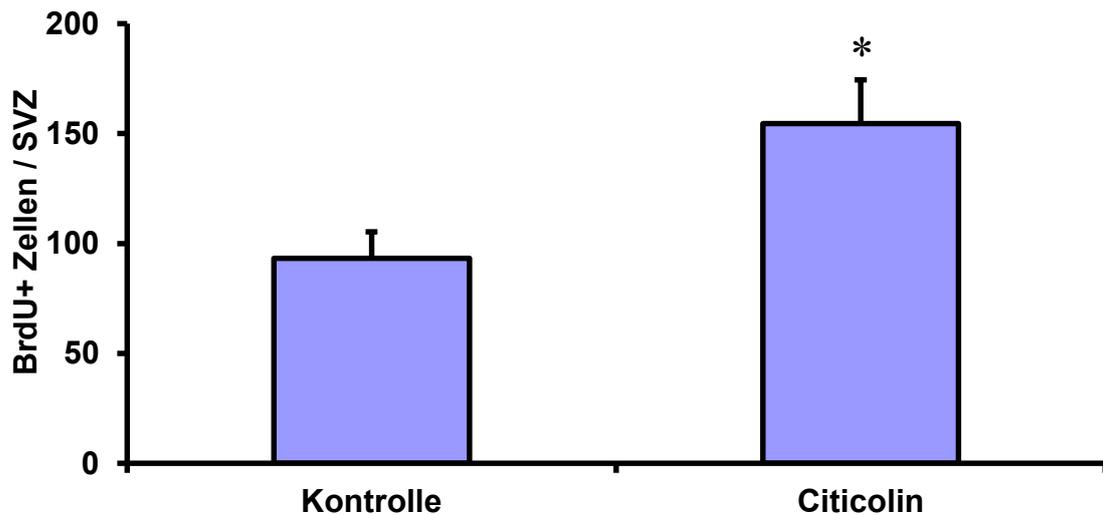
**Abbildung 3-6:** Prozentualer Anteil der neugebildeten Neuronen im *Gyrus dentatus* des Hippokampus. Die Behandlung mit Citicolin führte zu einem signifikant höheren Anteil der gleichzeitig BrdU- und NeuN-positiven Zellen ( $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit p-Wert  $< 0,05$ .

Die absolute Zahl von Neuronen wurde aus der Anzahl BrdU-positiver Zellen und dem Anteil der davon NeuN-positiven Zellen errechnet. Die absolute Neuronenzahl ist in Abbildung 3-7 dargestellt. Der Mittelwert der Anzahl der Neuronen in der Therapiegruppe war mit 127,28 höher als in der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von 35,85 Neuronen ( $p < 0,05$ ).



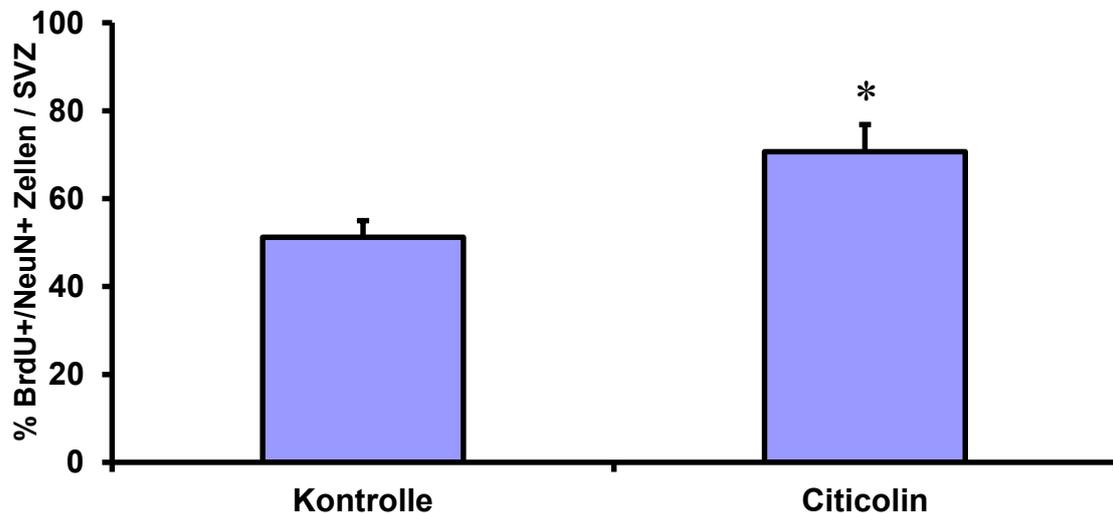
**Abbildung 3-7:** Die absolute Zahl der neugebildeten Neuronen im *Gyrus dentatus* des Hippokampus. In der Therapiegruppe war die Anzahl der doppelpositiven (BrdU- und NeuN-positiv) Zellen im *Gyrus dentatus* des Hippokampus signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit p-Wert  $< 0,05$ .

Im Bereich der Subventrikulärzone zeigte sich ebenfalls ein signifikant höherer Anteil BrdU-positiver Zellen in der Therapiegruppe mit einem Mittelwert von  $154,57 \pm 19,83$  im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von  $93,25 \pm 12,07$  Zellen ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3-8).



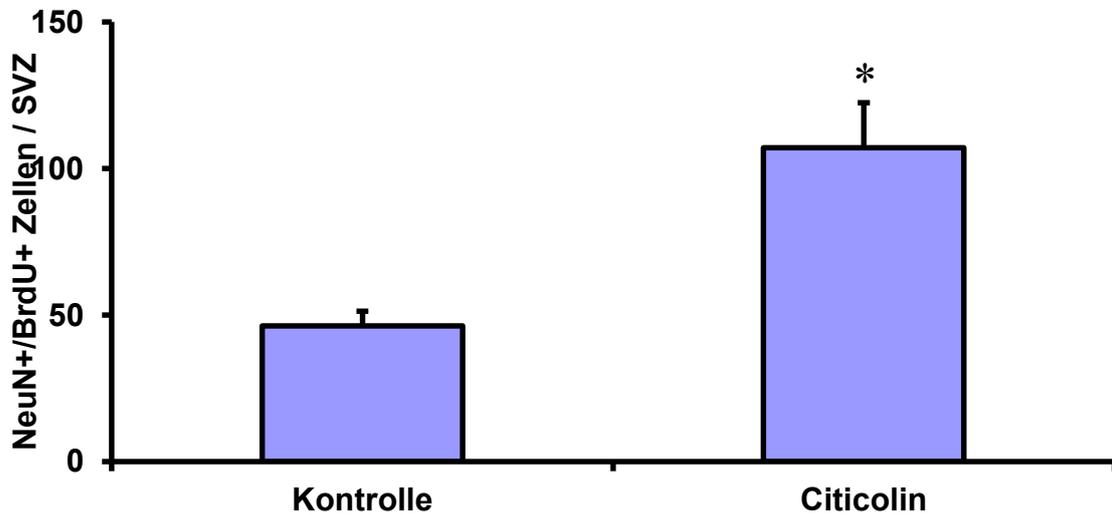
**Abbildung 3-8:** Zahl der BrdU-positiven Zellen in der Subventrikulärzone. In der Therapiegruppe war die Zahl der BrdU-positiven Zellen signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit p-Wert  $< 0,05$ .

Der prozentuale Anteil der doppelpositiven Zellen in der Subventrikulärzone lag in der Therapiegruppe bei  $70,71 \pm 6,12$  % und war signifikant höher als in der Kontrollgruppe mit  $51,25 \pm 3,75$  % ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3-9).



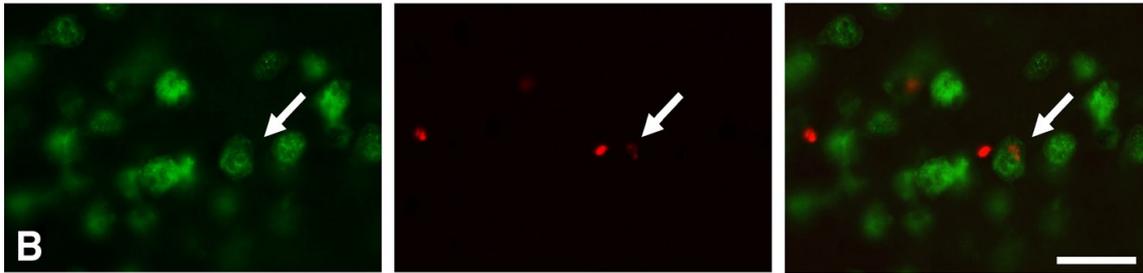
**Abbildung 3-9:** Prozentualer Anteil der doppelpositiven Zellen (BrdU- und NeuN-positiv) in der Subventrikulärzone. Die Behandlung mit Citicolin führte zu einem signifikant höheren Anteil der BrdU- und NeuN-doppelpositiven Zellen ( $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit p-Wert  $< 0,05$ .

Daraus ergab sich der Mittelwert der absoluten Zahlen von Neuronen in der Therapiegruppe mit 107,11 Neuronen und in der Kontrollgruppe mit 46,33 Neuronen ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3-10).



**Abbildung 3-10:** Die Zahl der doppelpositiven (BrdU- und NeuN-positiv) Zellen in der Subventrikulärzone. Die absolute Zahl der Neuronen war in der Therapiegruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit p-Wert  $< 0,05$ .

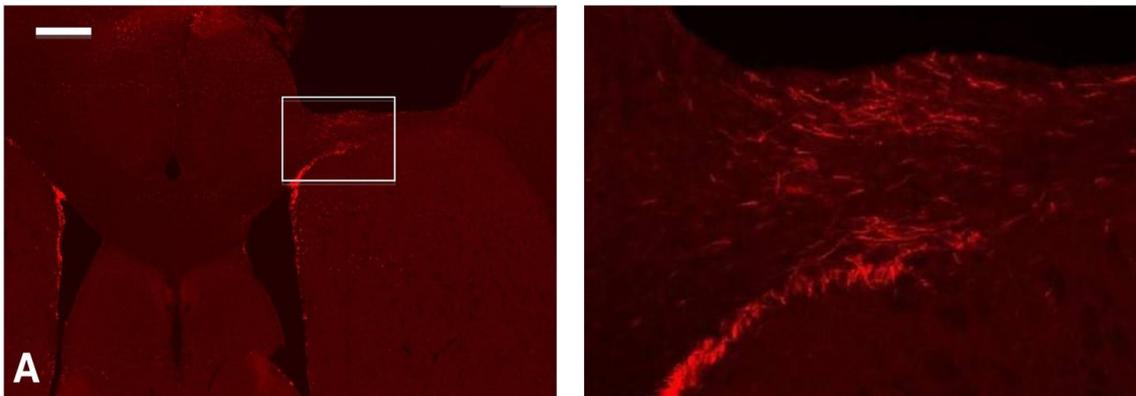
Die BrdU-Markierung diente der Detektion aller neugebildeten Zellen nach induziertem Schlaganfall unter Citicolin- bzw. Placebogabe. In der SVZ und im *Gyrus dentatus* wurde zur Quantifizierung der Neurogenese der Mittelwert der BrdU-positiven Zellen bestimmt, die gleichzeitig den neuronalen Marker NeuN exprimieren. In der Mikroskopischen Analyse der Peri-Infarktregion zeigten sich unter Therapie mit Citicolin ebenfalls signifikant mehr doppelpositive Zellen (BrdU- und NeuN-positiv) im Vergleich zur Placebobehandlung (Abb. 3-11).



**Abbildung 3-11:** Immunhistochemische Kombinationsfärbung von BrdU und NeuN. Aufnahme der Peri-Infarktregion unter Citicolintherapie. BrdU-positive Zellen leuchten rot. Die NeuN-positive Zellen leuchten grün (Pfeil; links: NeuN, mitte: BrdU, rechts: doppelpositive Zellen). Maßstab 100 µm.

### 3.2.3 DCX-Färbung

Mit der DCX-Färbung wurden neugeborene Vorläuferzellen bzw. unreife Neuronen dargestellt. In der mikroskopischen Analyse (Abb. 3-12) zeigte sich unter der Therapie mit Citicolin eine verstärkte Migration der neuronalen Vorläuferzellen (DCX-positiven Zellen) zum Ort der Ischämie.



**Abbildung 3-12:** Beurteilung der Migration der neuronalen Vorläuferzellen (DCX-positiven Zellen) nach kortikaler Ischämie unter Therapie mit Citicolin. Aufnahme der postischämischen Hirnläsion 28 Tage nach Ischämie (links). Vergrößerung (rechts). Maßstab entspricht 120 µm.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Verhaltenstests zeigen, dass die Therapie mit Citicolin im Vergleich zur Placebobehandlung zu einer signifikant besseren funktionellen Erholung im *Adhesive tape removal* Test und im Zylindertest führt.

In den histologischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Stimulation mit Citicolin nach einem Schlaganfall die Neurogenese im Hippokampus und in der SVZ signifikant steigert. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass neuronale Vorläuferzellen von der SVZ zur Infarktregion migrieren.

### 4.2 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.2.1 Verhaltenstests

In der vorliegenden Arbeit haben wir eine Batterie von Verhaltenstests verwendet, die es ermöglicht, ein breites Spektrum motorischer sowie sensorischer Fähigkeiten zu erfassen und Aufschluss über das Allgemeinbefinden der Tiere zu liefern.

Mit dem Zylindertest und dem *Adhesive tape removal* Test wurde die funktionelle Erholung erfasst. In der vorliegenden Arbeit zeigten die mit Citicolin behandelten Tiere im Zylindertest eine signifikant verbesserte Erholung im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe. Die sensomotorischen Defizite besserten sich langsam über Beobachtungszeitraum mit einer deutlichen Verbesserung bei der zweiten, dritten und vierten Testung. Diese Verbesserung liegt deutlich außerhalb des Zeitfensters für neuroprotektive Effekte und ist Ausdruck neuroregenerativer Prozesse.

Der *Adhesive tape removal* Test ist ein sensibler Test um die sensorischen und feinmotorischen Fertigkeiten zu messen (Schallert *et al.*, 1982). Die Tiere der Therapiegruppe zeigten eine signifikant bessere funktionelle Erholung im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die deutlichste funktionelle Erholung zeigten die Tiere bei den letzten zwei Testungen am Tag 21 und 28. Somit bestätigte dieser Test, dass der verbesserten Erholung durch Citicolin neuroregenerative Prozesse zugrunde liegen.

Im Rotarod-Test ergab die statistische Analyse bei der funktionellen Erholung keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Therapiegruppe. Das steht nicht im Konflikt mit den Ergebnissen der beiden anderen Verhaltenstests. Ein wahrscheinlicher Grund dafür ist die geringe Sensitivität des Rotarod-Tests. Die Defizite, die durch Fotothrombose entstanden sind, sind möglicherweise zu gering und können von den Tieren gut kompensiert werden.

Die Behandlung mit Citicolin wurde entsprechend dem Zeitpunkt in einer aktuellen klinischen Citicolin-Studie (ICTUS) 24 Stunden nach Beginn der Ischämie eingeleitet (Davalos *et al.*, 2012). Obwohl die Behandlung mit Citicolin außerhalb des Zeitfensters für Neuroprotektion liegt, zeigen die Ergebnisse des Zylindertests und des *Adhesive tape removal* Tests eine gesteigerte funktionelle Erholung. Da bei der Toluidinfärbung keine signifikante Reduktion des Infarkt volumens in der Therapiegruppe festgestellt werden konnte, können die positiven Effekte nach der Behandlung mit Citicolin nicht auf die Unterschiede im kortikalen Läsionsvolumen zurückgeführt werden. Diese positiven Ergebnisse jenseits des akuten ischämischen Schlaganfalls deuten darauf hin, dass Citicolin noch andere Mechanismen induziert (Kriz und Lalancette-Hebert, 2012) und bestätigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die eine verbesserte funktionelle Erholung als Folge regenerativer Prozesse zeigen konnten (Hurtado *et al.*, 2011; Hurtado *et al.*, 2007; Hurtado *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Lagace, 2012).

Neben den Verhaltenstests wurde in der Arbeit auch der Gewichtsverlauf der Tiere in den Gruppen verglichen. Nach der Ischämie konnte in beiden Gruppen eine vorübergehende Gewichtsabnahme im Vergleich zum Ausgangsgewicht beobachtet werden. Die Gewichtsreduktion ist als Folge der operationsbedingten Belastung der Tiere und der reduzierten Futter- und Wasseraufnahme in der Aufwach- und Erholungsphase zu deuten. Im Verlauf nahmen die mit Citicolin behandelten Tiere signifikant stärker an Gewicht zu. Ein möglicher Grund dafür ist die bessere Erholung der Tiere der Behandlungsgruppe, die sich im Fressverhalten widerspiegelt.

#### **4.2.2 Histologische Untersuchungen**

Für die morphologische Untersuchung hinsichtlich des Nachweises der neuroregenerativen Wirkung von Citicolin haben wir die Marker BrdU und DCX

verwendet. Beide sind valide Marker für die Neurogenese und werden standardmäßig eingesetzt (Kuhn *et al.*, 2007; Gould *et al.*, 1999; Kornack *et al.*, 1999; Eriksson *et al.*, 1999; von Bohlen, 2007). Die Verwendung beider Marker erlaubt verschiedene Zeitpunkte der Neurogenese zu untersuchen und zusammen mit der NeuN-Färbung die Herkunft der neu entstandenen Zellen zu bestimmen (von Bohlen, 2007).

BrdU wurde für die Markierung von proliferierenden Zellen verwendet und in dieser Arbeit in beiden Gruppen parallel zur Therapiephase gegeben. Somit reflektieren die BrdU-positiven Zellen die Anzahl der neu gebildeten Zellen während der Therapiephase. Im gesunden Gehirn wandern bei der adulten Neurogenese die neugeborenen Neuronen aus der subgranulären Zone zum *Gyrus dentatus* des Hippokampus und aus der SVZ zum *Bulbus olfactorius* (Zhao *et al.*, 2008). Das ischämische Ereignis ändert dieses Muster der adulten Neurogenese und stimuliert die Migration der neugeborenen Neuronen aus der SVZ und der subgranulären Zone zum Ort der Läsion (Yamashita *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Osman und die Kollegen haben nachgewiesen, dass die postischämische Läsion bis zu einem Jahr nach dem Schlaganfall die Vorläuferzellen erhält (Osman *et al.*, 2011). Analog zu den Ergebnissen von Osman und Kollegen fanden wir in den untersuchten Regionen, dem *Gyrus dentatus*, der SVZ und der Peri-Infarktregion nach dem ischämischen Ereignis in der Therapiegruppe eine signifikant höhere Zahl der BrdU-positiven Zellen. Die Ergebnisse belegen die regenerative Wirkung von Citicolin, lassen aber keinen Schluss auf die Art der neugebildeten Zellen zu. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Doppelfärbung mit BrdU/NeuN durchgeführt, um den neuronalen Ursprung der neu entstandenen Zellen zu beweisen. Wir fanden heraus, dass in den untersuchten Regionen die Anzahl der neu entstandenen Neuronen in der Therapiegruppe signifikant höher als in der Placebogruppe war. Dies deutet auf die verstärkte Neurogenese während der Therapie mit Citicolin hin und kann entweder auf die Steigerung der Zellproliferation oder auf das längere Überleben der neu gebildeten Zellen zurückgeführt werden.

Im Unterschied zu BrdU ist DCX ein interner Marker und wird in der Literatur als Marker für frühe Stadien der adulten Neurogenese beschrieben. Es wird nur kurzfristig in den neu gebildeten Zellen (Vorläuferzellen) exprimiert (von Bohlen, 2007; Corbo *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte analog zu den Ergebnissen von Osman und Kollegen die Migration

der neuronalen Vorläuferzellen (DCX-positiven Zellen) zum Ort der Ischämie 28 Tage nach dem ischämischen Ereignis gezeigt werden (Osman *et al.*, 2011).

Ein kausaler Zusammenhang zwischen Neurogenese und funktioneller Erholung ist bis heute nicht eindeutig bewiesen, dennoch hochgradig wahrscheinlich. Die Verbesserung der funktionellen Erholung in Verbindung mit einer gesteigerten Neurogenese verdeutlicht das neuroregenerative Potenzial von Citicolin und erweitert die Erkenntnisse von Hurtado und Kollegen hinsichtlich der zugrundeliegenden Mechanismen (Hurtado *et al.*, 2007).

### 4.3 Diskussion der Methoden

Zerebrovaskuläre Erkrankungen beim Menschen sind in ihrer Ausprägung äußerst variabel. Daher können die komplexen biochemischen und molekularen Zusammenhänge nur im standardisierbaren Tierversuch untersucht werden. Der Vorteil der Simulation in Tiermodellen liegt in der Reproduzierbarkeit und der Möglichkeit, verschiedene Ausgangs- und Endsituationen zu definieren und somit die ganze Bandbreite an Variationen auszuschöpfen (Ginsberg, 2003). In dieser Arbeit haben wir uns für Ratten als Versuchstiere entschieden, weil sie eine dem Menschen vergleichbare Blutversorgung des Gehirns und Physiologie des zerebrovaskulären Systems aufweisen (Jacob und Kwitek, 2002).

In dieser Arbeit wurden die Tiere mit einer Dosis von 100 mg/kg Citicolin behandelt. Die hier gewählte Citicolin-Dosis stützt sich auf vorherige Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass 100 mg/kg täglich appliziert werden können und gut vertragen werden (Schäbitz *et al.*, 1996).

Neben der Dosis ist die Art der Verabreichung von Bedeutung. Es gibt verschiedene Möglichkeiten Citicolin zu applizieren: oral, i.v. und i.p.. Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass die Aufnahme im Gehirn bei intravenöser Gabe bei 2 % liegt und nur bei 0,5 % bei oraler Gabe (Fresta und Puglisi, 1999; Agut *et al.*, 1983). Die Ergebnisse früherer Studien konnten keinen signifikanten Unterschied in der Wirkung zwischen der intravenösen und der intraperitonealen Gabe zeigen (Adibhatla *et al.*, 2005). Wir haben uns für die i.p.-Gabe entschieden, da diese einfacher täglich zu handhaben und für die Tiere weniger invasiv ist. Gegen die orale Therapie spricht die schlechte Kontrolle über die verabreichte Dosis.

Die erste Gabe des Medikaments erfolgte 24 Stunden nach der Ischämie. Das liegt außerhalb des Zeitfensters für Neuroprotektion und lässt gute Schlüsse auf die neuroregenerativen Prozesse zu. Darüber hinaus stellt es eine Therapieoption für Patienten dar, die das Krankenhaus jenseits des Zeitfensters für die einzige spezifische Therapie, der systemischen Thrombolyse, erreichen und eröffnet Möglichkeiten bei der Behandlung eines chronischen Schlaganfalls.

#### **4.4 Klinische Implikation**

Der Schlaganfall ist eine der führenden Ursachen für bleibende Invalidität im Erwachsenenalter und die dritthäufigste Todesursache in den Industrienationen.

Trotz der enormen Mortalität und Morbidität von Schlaganfällen sind die Behandlungsmöglichkeiten bis heute sehr begrenzt (Minnerup *et al.*, 2011). Das einzige Medikament, das aktuell zur Therapie von Schlaganfällen zugelassen ist, ist der rekombinante Gewebe-Plasminogen-Aktivator (rt-PA). Obwohl es schon seit 1995 in den klinischen Alltag integriert ist, erhält nur ein geringer Teil der Patienten diese Therapie (Kidwell *et al.*, 2003; Kleindorfer *et al.*, 2008; Minnerup *et al.*, 2011). Der wichtigste Grund dafür ist das schmale Zeitfenster (Hacke *et al.*, 2008). Weitere Gründe sind die zahlreichen Kontraindikationen und Nebenwirkungen, wie z. B. die erhöhte allgemeine Blutungsgefahr. Angesichts dieser Tatsachen werden dringend neue Therapieansätze in der Schlaganfalltherapie benötigt.

In den letzten Jahren wurden viele pathophysiologische Mechanismen des ischämischen Schlaganfalls einschließlich postischämischer regenerativer Vorgänge identifiziert und verstanden. Der medikamentöse Einfluss dieser Mechanismen hat aber bis heute nicht zu einer deutlichen klinischen Funktionsverbesserung geführt. Ein häufiger Grund hierfür waren Nebenwirkungen der untersuchten Therapien, zudem war das in den klinischen Studien gewählte therapeutische Zeitfenster häufig länger als in den tierexperimentellen Studien.

Zu den am vielversprechendsten und in experimentellen Studien am besten untersuchten Substanzen gehört Erythropoetin (EPO). EPO ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der im Gehirn von praktisch allen Zellen gebildet wird und in tierexperimentellen Studien neben neuroprotektiven auch neuroregenerative Eigenschaften besitzt (Wang *et al.*, 2004; Villa *et al.*, 2003). In einer Vielzahl präklinischer Studien war EPO hinsichtlich der

Infarkt volumenreduktion und des funktionellen Outcome wirksam. In einer klinischen Phase III Studie war die Therapie mit EPO bei Schlaganfallpatienten jedoch nicht wirksam. Der Grund hierfür ist unter anderem, dass bei gleichzeitiger Lysetherapie schwerwiegende Komplikationen auftraten (Ehrenreich *et al.*, 2009; Minnerup *et al.*, 2009; Bath *et al.*, 2013).

Eine weitere vielversprechende Substanz in tierexperimentellen Studien war der Wachstumsfaktor G-CSF. In tierexperimentellen Modellen wurden eine Reduktion der Infarktgröße und die funktionelle Erholung unter Therapie mit G-CSF wiederholt gezeigt (Minnerup *et al.*, 2008). Die neuroprotektiven Effekte konnten in klinischen Studien jedoch nicht nachwiesen werden (Ringelstein *et al.*, 2013). Ein möglicher Grund für die fehlende Wirksamkeit könnte die erhöhte Körpertemperatur bei behandelnden Patienten im Vergleich zur den Patienten der Placebogruppe sein, die bekanntermaßen mit einer stärkeren Infarkt volumenzunahme assoziiert ist. EPO und G-CSF sind Beispiele dafür, dass in Tierstudien nicht untersuchte Nebenwirkungen, wie sie in Kombination mit rt-PA auftreten oder nicht identifizierte Nebenwirkungen, wie die erhöhte Körpertemperatur, zur fehlerhaften Translationen beitragen können.

Die Lasertherapie wurde in der Vergangenheit ebenfalls als vielversprechender Ansatz angesehen und hat sich als negativ erwiesen (Kasner *et al.*, 2013).

Ein aussichtsreicher Kandidat für die Therapie des ischämischen Schlaganfalls ist das Humanalbumin. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Albumin nach zerebraler Ischämie die Infarktgröße vermindert und zu einer Verbesserung der funktionalen Erholung führt (Liu *et al.*, 2001; Belayev *et al.*, 2001). Die Wirkung wurde dabei in einem Zeitfenster von bis zu 4 Stunden nach einer Ischämie untersucht. Mechanismen der Wirkung von Albumin sind die Reduktion der Hirnschwellung (Matsui *et al.*, 1993), eine entzündungshemmende Aktivität und die Wiederherstellung der Integrität neuronaler Zellen (Belayev *et al.*, 2005; Parkkinen *et al.*, 2007). Bis heute fehlen jedoch überzeugende Beweise der neuroprotektiven Wirkung von Albumin in klinischen Studien. Darüber hinaus ist das schmale Zeitfenster von 4 Stunden schwer in dem klinischen Alltag umsetzbar. Es bedarf einer weiteren Klärung, ob das Zeitfenster erweitert werden kann.

Die besten Hinweise hinsichtlich Effektivität bei gleichzeitig gutem Sicherheitsprofil bestehen aktuell für Citicolin. Es ist ein komplexes organisches Molekül, das als

Zwischenprodukt in der Biosynthese der Zellmembranphospholipiden dient (Kennedy, 1956). Es ist bekannt, dass eine Schädigung der Zellmembranintegrität einer der wichtigsten Mediatoren des Zelltodes ist. Da die Phospholipide ein wesentlicher Bestandteil der Zellmembranen sind, ist deren Schutz und die Reparatur eine vielversprechende Strategie in der Behandlung von Schlaganfall (Schäbitz *et al.*, 1996). Es wurden bereits mehrere Zeitpunkte der Behandlung mit Citicolin und unterschiedliche Dosierungen untersucht (Schäbitz *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zu den obengenannten Substanzen ist Citicolin nebenwirkungsarm und wurde bereits in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien auf seine Sicherheit überprüft. Die präklinischen Studien an Hunden und Nagetieren zeigten keine toxische Wirkung von Citicolin. Dies bestätigte sich auch in klinischen Studien. Es sind bis heute 13 randomisierte klinische Studien durchgeführt worden. Eine Meta-Analyse von 10 Studien zeigte eine Senkung der Mortalität und der schweren Behinderungen nach Behandlung mit Citicolin mit einem guten Sicherheitsprofil. Es wurden keine schwerwiegenden Nebenwirkungen festgestellt, lediglich gastrointestinale Beschwerden und Kopfschmerzen traten gelegentlich auf (Saver, 2008; Clark *et al.*, 2001; Secades und Lorenzo, 2006).

Zahlreiche tierexperimentelle Studien belegen die cholinerge und neuroprotektive Wirkung von Citicolin (Grieb *et al.*, 2001; D'Orlando und Sandage, 1995; Schäbitz *et al.*, 1996; Schäbitz *et al.*, 1999; Onal *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1998; Shuaib *et al.*, 2000; Adibhatla and Hatcher, 2002; Adibhatla und Hatcher, 2005). Darüber hinaus ist in präklinischen Studien ein positiver Effekt bei einer gleichzeitigen Gabe von Citicolin und rt-PA gezeigt worden (Shuaib *et al.*, 2000; Alonso de Lecinana *et al.*, 2006). Andere präklinische Studien deuten auf eine Verbesserung der neuroprotektiven Wirkung bei Kombination von Citicolin mit anderen neuroprotektiven Medikamenten, wie dem NMDA-Antagonisten Mk-801, dem Natrium-Kanal-Hemmer Lamotrigin oder dem Kalciumantagonisten Nimodipin hin (Onal *et al.*, 1997; Ataus *et al.*, 2004; Sobrado *et al.*, 2003).

In kleineren klinischen Studien wurde ein positiver Therapieeffekt für Citicolin nachgewiesen (Davalos *et al.*, 2002; Secades, 2002). In einer aktuellen großen klinischen Citicolin-Studie (ICTUS) zeigt das Medikament in bestimmten Subgruppen der

Schlaganfallpatienten einen positiven Therapieeffekt, sodass noch weitere klinische Studien erfolgen müssen, um die Wirksamkeit zu belegen (Davalos *et al.*, 2012).

Die Tatsache, dass Citicolin in Bezug auf sein Nebenwirkungsprofil und die Verträglichkeit gut untersucht ist, erleichtert die weitere klinische Erforschung der neuroregenerativen Wirkung.

#### **4.5 Fazit und Ausblick**

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die subakute Citicolin-Behandlung nach einem fotothrombotisch induzierten Schlaganfall der Ratte die funktionelle Erholung verbessert. Als den durch Citicolin verbesserten funktionellen Erholung zugrundeliegenden Mechanismen konnten wir eine gesteigerte Neurogenese im Hippokampus und der SVZ ermitteln. Die in dieser Region neugebildeten Neuronen migrieren zum Infarkt und können die Funktionen verloren gegangenen Gewebes übernehmen. Es ist jedoch nicht eindeutig geklärt, wie viele der neu gebildeten Zellen sich zu voll funktionsfähigen Neuronen entwickeln und wie lange diese Zellen überleben. Gegenstand zukünftiger Studien könnte die genauere Erforschung der Überlebenszeit der neu entstandenen Neuronen und deren Funktionsfähigkeit sein. Darüber hinaus können weitere regenerative Mechanismen wie die Dendrito-, Angio-, oder die Synaptogenese untersucht werden. Insbesondere kann die Erforschung der Wirksamkeit und der Sicherheit einer Kombinationstherapie von Citicolin mit rt-PA sowie mechanische Rekanalisationsverfahren von Interesse sein.

Die Wirksamkeit 24 Stunden nach ischämischem Ereignis verdeutlicht das neuroregenerative Potenzial von Citicolin und eröffnet vielversprechende Möglichkeiten bei der Behandlung des chronischen Schlaganfalls.

## 5 Literaturverzeichnis

Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*; 24(1): 35-41.

Adibhatla RM, Hatcher JF (2002) Citicoline mechanisms and clinical efficacy in cerebral ischemia. *J Neurosci Res.*; 70: 133-139.

Adibhatla RM, Hatcher JF (2005) Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) in stroke and other CNS disorders. *Neurochem Res.*; 30: 15-23.

Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ (2001) Effects of citicoline on phospholipid and glutathione levels in transient cerebral ischemia. *Stroke*; 32:2376-2381.

Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ (2002) Citicoline: neuro-protective mechanisms in cerebral ischemia. *J Neurochem.*; 80: 12-23.

Adibhatla RM, Hatcher JF, Larsen EC, Chen X, Sun D, Tsao FH (2006) CDP-choline significantly restores phosphatidylcholine levels by differentially affecting phospholipase A2 and CTP: phosphocholine cytidyltransferase after stroke. *J Biol Chem.*; 281: 6718-6725.

Agut J, Font E, Sacristan A, Ortiz JA (1983) Radioactivity incorporation into different cerebral phospholipids after oral administration of <sup>14</sup>C methyl CDP-choline. *Arzneimittelforschung*; 33:1048-1050.

Akulinin VA, Stepanov SS, Semchenko VV, Belichenko PV (1997) Dendritic changes of the pyramidal neurons in layer V of sensory-motor cortex of the rat brain during the postresuscitation period. *Resuscitation*; 35(2): 157-64.

Alonso de, Lecinana M, Gutierrez M, Roda JM, Carceller F, Diez-Tejedor E (2006) Effect of combined therapy with thrombolysis and citicoline in a rat model of embolic stroke. *J Neurol Sci.*; 247: 121-129.

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo J (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*; 22(3): 629-634.

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.*; 8: 963-970.

Ataus SA, Onal MZ, Ozdem SS, Locke KW, Balkan S (2004) The effects of citicoline and lamotrigine alone and in combination following permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Int J Neurosci.*; 114: 183-196.

Bath PM, Sprigg N, England T (2013) Colony stimulating factors (including erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and analogues) for stroke. *Cochrane Database Syst Rev.*; 24;6.

Belayev L, Liu Y, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD (2001) Human albumin therapy of acute ischemic stroke: marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with a broad therapeutic window. *Stroke*; 32: 553-560.

Belayev L, Marcheselli VL, Khoutorova L, Rodriguez de Turco EB, Busto R, Ginsberg MD, Bazan NG (2005) Docosahexaenoic acid complexed to albumin elicits high-grade ischemic neuroprotection. *Stroke*; 36: 118-123.

Brezun JM, Daszuta A (1999) Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience*; 89: 999-1002.

Cameron HA, McKay RD (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci*; 2: 894-897.

Cameron HA, Hazel TG, McKay RD (1998) Regulation of Neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol*; 36: 287-306.

Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*; 435: 406-417.

Clark WM, Gunionrinker L, Lessov N, Hazel K (1998) Citicoline treatment for experimental intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke*; 29: 2136-2139.

Clark WM, Wechsler LR, Sabounjian LA, Schwiderski UE (2001) A phase III randomized efficacy trial of 2000 mg citicoline in acute ischemic stroke patients. *J Neurol*; 257(9): 1595-602.

Corbo JC, Deuel TA, Long JM, LaPorte P, Tsai E, Wynshaw-Boris A, Walsh CA (2002) Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J Neurosci*; 1;22(17): 7548-7557.

Davalos A, Castillo J, Alvarez-Sabin J, Secades JJ, Mercadal J, Lopez S, Cobo E, Warach S, Sherman D, Clark WM, Lozano R (2002) Oral citicoline in acute ischemic stroke: an individual patient data pooling analysis of clinical trials. *Stroke*; 33: 2850-2857.

Dávalos A, Alvarez-Sabín J, Castillo J, Díez-Tejedor E, Ferro J, Martínez-Vila E, Serena J, Segura T, Cruz VT, Masjuan J, Cobo E, Secades JJ (2012) Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial). *Lancet*; 380(9839): 349-357.

DeVries AC, Nelson RJ, Traystman RJ, Hurn PD (2001) Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neurosci Biobehav Rev.*; 25: 325-342.

Diener HC, Hacke W, Forsting M (2004) Schlaganfall. Thieme.

Dijkhuizen RM, Ren J, Mandeville JB, Wu O, Ozdag FM, Moskowitz MA, Rosen BR, Finklestein SP (2001) Functional magnetic resonance imaging of reorganization in rat brain after stroke. *Proc Natl Acad Sci.*; 98(22): 12766-12771.

Dijkhuizen RM, Singhal AB, Mandeville JB, Wu O, Halpern EF, Finklestein SP, Rosen BR, Lo EH (2003) Correlation between brain reorganization, ischemic damage, and neurologic status after transient focal cerebral ischemia in rats: a functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci*; 23(2): 510-7.

Dirnagl U, Ladecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*; 22: 391-397.

D'Orlando KJ, Sandage BWJr (1995) Citicoline (CDP-choline) mechanisms of action and effects in ischemic brain injury. *Neurol.Res.*; 17, 281-284.

Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*; 55: 310-318.

Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.*; 57: 1835-1840.

Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegrzyn M, Jähnig P, Herrmann M, Knauth M, Bähr M, Heide W, Wagner A, Schwab S, Reichmann H, Schwendemann G, Dengler R, Kastrup A, Bartels C (2009) Recombinant Human Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Stroke*; 40(12): 647-56.

Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ (2000) Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97: 7579-7584.

Enright LE, Zhang S, Murphy TH (2007) Fine mapping of the spatial relationship between acute ischemia and dendritic structure indicates selective vulnerability of layer V neuron dendritic tufts within single neurons in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.*; 27(6): 1185-200.

Eriksson PS, Perflieva E, Björk-Erikson T, Alborn A, Nordberg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*; 4: 1313-1317.

Fisher M, Garcia JH (1996) Evolving stroke and the ischemic penumbra. *Neurology*; 47: 884-888.

Fresta M, Puglisi G (1999) Reduction of maturation phenomenon in cerebral ischemia with CDP-choline-loaded liposomes. *Pharm Res.*; 16: 1843-1849.

Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science*; 287(5457): 1433-1438.

Galea LA, McEwens BS (1999) Sex and seasonal differences in the rate of cell proliferation in the dentate gyrus of adult wild meadow voles. *Neuroscience*; 89: 955-964.

Ginsberg MD (2003) Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection. *Stroke*; 34(1): 214-23.

Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR (2002) Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol.*; 88: 2187-2195.

Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS (1992) Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci.*; 12: 3642-3650.

Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.*; 17: 2492-2498.

Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E (1999) Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96(9): 5263-7.

Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by Stress. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95: 3168-3171.

Grieb P, Gadamski R, Wojda R, Janisz M (2001) CDP-choline, but not cytidine, protects hippocampal CA1 neurones in the gerbil following transient forebrain ischaemia. *Folia Neuropathol.*; 39: 141-145.

Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Maching T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.*; 359: 1317-1329.

Hamann GF (1997) Der akute Hirninfarkt: Pathophysiologie und moderne Therapiekonzepte. *Radiol.*; 37(11): 843-852.

Heuschmann PU, Busse O, Wagner M, Endres M, Villringer A, Röther J, Kolominsky-Rabas PL, Berger K (2010) Frequency and Care of Stroke in Germany. *Akt Neurol.*; 37: 333-340.

Heuschmann PU, Di Carlo A, Bejot Y, Rastenyte D, Ryglewicz D, Sarti C, Torrent M, Wolfe CD (2009) European Registers of Stroke (EROS) Investigators: Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. *Stroke*; 40: 1557-1563.

Hossmann KA (1987) Experimentelle Grundlagen der Ischämietoleranz des Hirns. *Z Kardiol.*; 76: (Suppl.4), 47-66.

Hossmann KA (2005) Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol.*; 26(7-8): 1057-83.

Hurtado O, Cardenas, A, Pradillo JM, Morales JR, Ortego F, Sobrino T, Castillo J, Moro MA, Lizasoain I (2007) A chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke. *Neurobiol Dis.*; 26(1): 105-11.

Hurtado O, Lizasoain I, Moro MA (2011) Neuroprotection and recovery: recent data at the bench on citicoline. *Stroke*; 42(1 Suppl): S33-5.

Hurtado O, Pradillo JM, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Sobrino T, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA (2006) Neurorepair versus Neuroprotection in Stroke. *Cerebrovasc Dis* ; 21(Suppl.2): 54-63.

Hurtado O, Pradillo JM, Fernandez-Lopez D, Morales JR, Sobrino T, Castillo J, Alborch E, Moro MA, Lizasoain I (2008) Delayed post-ischemic administration of CDP-choline increases EAAT2 association to lipid rafts and affords neuroprotection in experimental stroke. *Neurobiol Dis.*; 29: 123-131.

Jacob HJ, Kwitek AE (2002) Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet.*; 3: 33-42.

Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *PNAS*; 98: 4710-4715.

Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101: 343-347.

Johnston SC, Mendis S, Mathers CD (2009) Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. *Lancet Neurol.*; 8: 345-354.

Jones BJ, Roberts DJ (1968) The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol.*; 20(4): 302-304.

Kapuscinski J (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem.*; 70(5): 220-33.

Kasner SE, Rose DZ, Skokan A, Walker MG, Shi J, Streeter J (2013) Transcranial laser therapy and infarct volume. *Stroke*; 44(7): 2025-2027.

Katsura K, Kristian T, Smith ML, Siesjo BK (1994) Acidosis induced by hypercapnia exacerbates ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab.*; 14(2): 243-50.

Kee NJ, Preston E, Wojtowicz JM (2001) Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. *Experimental Brain Research*; 136: 313-320.

Keiner S, Witte OW, Redecker C (2009) Immunocytochemical detection of newly generated neurons in the perilesional area of cortical infarcts after intraventricular application of brain-derived neurotrophic factor. *J Neuropathol Exp Neurol.*; 68:83-93.

Kempermann G, Gage FH (1999) Experience-dependent regulation of adult hippocampal Neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus*; 9: 321-332.

Kempermann G, Gage FH (2000) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp.*; 231: 220-235.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997a) Genetic influence on Neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94: 10409-10414.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997b) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*; 386: 493-495.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentat gyrus. *J Neurosci.*; 18: 3206-3212.

Kennedy EP (1956) The synthesis of cytidine diphosphate choline, cytidine diphosphate ethanolamine, and related compounds. *J. Biol. Chem.*; 222: 185-191.

Koh JS, Lee SJ, Ruy CW, Kim HS (2012) Safety and efficacy of mechanical thrombectomy with solitaire stent retrieval for acute ischemic stroke: a systematic review. *Neurointervention*; 7(1):1-9.

Kolb B, Forgie M, Gibb R, Gorny G, Rowntree S (1998) Age, experience and the changing brain. *Neurosci Biobehav Rev.*; 22(2): 143-59.

Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundörfer B, Schöffski O, Krobot KJ (2006) Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke*; 37: 1179-1183.

Kornack DR, Rakic P (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96(10): 5768-73.

Kriz J, Lalancette-Hebert M (2012) Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.*; 117:497-509

Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM (2007) Bromodeoxyuridine and the detection of neurogenesis. *Curr Pharm Biotechnol.*; 8(3): 127-31.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.*; 16: 2027-2033.

Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci.*; 17: 5820-5829.

Labiche LA, Grotta J (2004) Clinical trials for cytoprotection in stroke. *NeuroRx.*; 1: 46-70.

Lagace DC (2012) Does the endogenous neurogenic response alter behavioral recovery following stroke? *Behav Brain Res.*; 227:426-432

Lee HJ, Kang JS, Kim YI (2009) Citicoline protects against cognitive impairment in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *J Clin Neurol.*; 5: 33-38.

Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH (2004) Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*; 44: 399-421.

Liu Y, Belayev L, Zhao W, Busto R, Belayev A, Ginsberg MD (2001) Neuroprotective effect of treatment with human albumin in permanent focal cerebral ischemia: histopathology and cortical perfusion studies. *Eur J Pharmacol.*; 428: 193-201.

Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR (1998) Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci.*; 18: 7768-7778.

Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science*; 271 (5251): 978-81.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci.*; 20: 9104-9110.

Martinez-Vila E, Irimia P (2005) Challenges of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke treatment. *Cerebrovasc Dis 20 Suppl.*; 2: 148-158.

Matsui T, Sinyama H, Asano T (1993) Beneficial effect of prolonged administration of albumin on ischemic cerebral edema and infarction after occlusion of middle cerebral artery in rats. *Neurosurgery*; 33: 293-300.

Minnerup J, Heidrich J, Rogalewski A, Schäbitz WR, Wellmann J (2009) The efficacy of erythropoietin and its analogues in animal stroke models: a meta-analysis. *Stroke*; 40(9): 3113-3120.

Minnerup J, Heidrich J, Wellmann J, Rogalewski A, Schneider A, Schäbitz WR (2008) Meta-analysis of the efficacy of granulocyte-colony stimulating factor in animal models of focal cerebral ischemia. *Stroke*; 39: 1855-1861.

Minnerup J, Schäbitz WR (2009) Multifunctional Actions of Approved and Candidate Stroke Drugs. *Neurotherapeutics*; 6(1): 43-52.

Minnerup J, Wersching H, Ringelstein EB, Schilling M, Schäbitz WR, Wellmann J, Berger K (2011) Impact of the extended thrombolysis time window on the proportion of recombinant tissue-type plasminogen activator-treated stroke patients and on door-to-needle time. *Stroke*; 42(10):2838-2843.

Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW (1996) Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.*; 726: 49-56.

Nedergaard M, Dirnagl U (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia*; 50: 281-286.

Nishida A, Emoto K, Shimizu M, Uozumi T, Yamawaki S (1994) Brain ischemia decreases phosphatidylcholine-phospholipase D but not phosphatidylinositol-phospholipase C in rats. *Stroke*; 25: 1247-1251.

Nogueira RG, Yoo AJ, Buonanno FS, Hirsch JA (2009) Endovascular Approaches to Acute Stroke, Part 2: A Comprehensive Review of Studies and Trials. *J Neuroradiol.*; 30: 859-875.

Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST (2006) A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci.*; 26:13007-13016.

Onal MZ, Li F, Tatlisumak T, Locke KW, Sandage BW Jr, Fisher M (1997) Synergistic effects of citicoline and MK-801 in temporary experimental focal ischemia in rats. *Stroke.*; 28: 1060-1065.

Osman AM, Porritt MJ, Nilsson M, Kuhn HG (2011) Long-term stimulation of neural progenitor cell migration after cortical ischemia in mice. *Stroke*; 42: 3559-3565.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*; 17: 3727-3738.

Parkkinen J, Ojala P, Niiranen J, Jolkkonen J (2007) Molecular mechanisms underlying neuroprotective effects of albumin after ischemic stroke. *Stroke*; 38: 255.

Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ (1999) CDP-choline: neuroprotection in transient forebrain ischemia of gerbils. *J Neurosci Res.*; 58: 697-705.

Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ (2001) Does CDPcholine modulate phospholipase activities after transient forebrain ischemia? *Brain Res.*; 893: 268-272.

Ringelstein EB, Thijs V, Norrving B, Chamorro A, Aichner F, Grond M, Saver J, Laage R, Schneider A, Rathgeb F, Vogt G, Charisse G, Fiebach JB, Schwab S, Schäbitz WR, Kollmar R, Fisher M, Brozman M, Skoloudik D, Gruber F, Leal JS, Veltkamp R, Köhrmann M, Berrouschot J (2013) Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients With Acute Ischemic Stroke. *Stroke* (Epub ahead of print)

Rogalewski A, Schneider A, Ringelstein EB, Schäbitz WR (2006) Toward a multimodal neuroprotective treatment of stroke. *Stroke*; 37(4): 1129-36.

Rossini PM, Altamura C, Ferreri F, Melgari JM, Tecchio F, Tombini M, Pasqualetti P, Vernieri F (2007) Neuroimaging experimental studies on brain plasticity in recovery from stroke. *Eura Medicophys.*; 43(2): 241-54.

Saka O, Mcguire A, Wolfe C (2009) Cost of stroke in the United Kingdom. *Age Ageing*; 38: 27-32

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal Neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*; 301: 805-809.

Saver J (2008) Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. *Rev. Neurol. Dis.*; 5: 167-177.

Schallert T, Upchurch M, Lobaugh N, Farrar SB, Spirduso WW, Gilliam P, Vaughn D, Wilcox RE (1982) Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacol Biochem Behav.*; 16: 455-62.

Schäbitz WR. Neues zur Akuttherapie des Schlaganfalls ([http://neurologie.uni-muenster.de/cms/upload/Reiz/Vortrag\\_Schbitz.pdf](http://neurologie.uni-muenster.de/cms/upload/Reiz/Vortrag_Schbitz.pdf)).

Schäbitz WR, Weber J, Takano K, Sandage BW, Locke KW, Fisher M (1996) The effects of prolonged treatment with citicoline in temporary experimental focal ischemia; *J Neurol Sci.*; 138(1-2): 21-5.

Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG, Schäbitz WR (2005) The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest.*; 115: 2083-98.

Secades JJ, Lorenzo JL (2006) Citicoline: pharmacological and clinical review, 2006 update. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology. Suppl.*; B: 1-56.

Secades JJ (2002) CDP-choline: update and review of its pharmacology and clinical use. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*; 24(Supp B): 1-53.

Secades JJ, Frontera G (1995) CDP-choline: pharmacological and clinical review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*; 17: 1-54.

Seki T, Arai Y (1995) Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport*; 6: 2479-2482.

Shuaib A, Yang Y, Li Q (2000) Evaluating the efficacy of citicoline in embolic ischemic stroke in rats: neuroprotective effects when used alone or in combination with urokinase. *Exp. Neurol.*; 161: 733-739.

Siesjö BK (1993) A new perspective on ischemic brain damage? *Prog Brain Res.*; 96: 1-9.

Siesjö BK (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanism of damage and treatment. *J Neurosurg.*; 77: 337-354.

Sobrado M, Lopez MG, Carceller F, Garcia AG, Roda JM (2003) Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. *Neuroscience.*; 118: 107-113.

Stemer AB, Huisa BN, Zivin JA (2010) The Evolution of Transcranial Laser Therapy for Acute Ischemic Stroke, Including a Pooled Analysis of NEST-1 and NEST-2. *Curr Cardiol Rep.*; 12: 29-3.

Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, Yodoi J, Ishikawa M, Hashimoto N (1999) Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res.*; 831: 283-287.

Takasawa K, Kitagawa K, Yagita Y, Sasaki T, Tanaka S, Matsushita K, Ohstuki T, Miyata T, Okano H, Hori H, Matsumoto M (2002) Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.*; 22: 299-307.

Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano JH, Okano H (2003) Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Neurosci.*; 23: 292-301.

Urbanska M, Blazejczyk M, Jaworski J (2008) Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*; 68(2): 264-88.

Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999a) Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 13427-13431.

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999b) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci.*; 2: 266-270.

Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P (2003) Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med.*; 198: 971-975.

von Bohlen, Halbach O (2007) Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.*; 329(3): 409-420.

Wallace CS, Kilman VL, Withers GS, Greenough WT (1992) Increases in dendritic length in occipital cortex after 4 days of differential housing in weanling rats. *Behav Neural Biol.*; 58(1): 64-68.

Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M (2004) Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*; 35: 1732-1737.

Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.*; 17(5): 497-504.

Werner C, Jantzen J, Löffler W (Hrsg.) (2000) *Neuroanaesthesie*. Thieme Verlag, Stuttgart: 121-142.

Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K (2006) Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci.*; 26: 6627-6636.

Yen CL, Mar MH, Zeisel SH (1999) Choline deficiency-induced apoptosis in PC12 cells is associated with diminished membrane phosphatidylcholine and sphingomyelin, accumulation of ceramide and diacylglycerol, and activation of a caspase. *FASEB J.*; 13: 135-142.

Zhang RL, Chopp M, Gregg SR, Toh Y, Roberts C, Letourneau Y, Buller B, Jia L, P Nejad Davarani S, Zhang ZG (2009) Patterns and dynamics of subventricular zone neuroblast migration in the ischemic striatum of the adult mouse. *J Cereb Blood Flow Metab.*; 29: 1240-1250.

Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M (2008) Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology*; 55: 345-52.

Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.*; 132: 645-660.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Übersicht über den zeitlichen Versuchsablauf.....	11
Abbildung 2-2: Rotarod-Test. Die Versuchstiere laufen auf einer Walze, die sich um horizontale Achse dreht. Es wird die durchschnittliche Laufzeit gemessen. ....	17
Abbildung 2-3: <i>Adhesive tape removal</i> Test. Hier wird die Zeit gemessen, die das Versuchstier braucht, um die Aufkleber von den Pfoten zu entfernen.....	18
Abbildung 2-4: Zylindertest. Beurteilt wurde die Asymmetrie bei der Berührung der Zylinderwand und des Zylinderbodens mit den Vorderpfoten.....	19
Abbildung 3-1: Zylindertest. Die mit Citicolin behandelten Tiere zeigten eine signifikante Verbesserung der Regeneration im Vergleich zu Placebogruppe (MW+/- SEM, $p < 0,05$ , ANOVA).....	28
Abbildung 3-2: <i>Adhesive tape removal</i> Test. Die Tiere der Therapiegruppe zeigten signifikant bessere funktionelle Erholung im Vergleich zu den Tieren der Placebogruppe (MW+/- SEM, $p < 0,05$ , ANOVA).....	29
Abbildung 3-3: Rotarod-Test. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Placebo- und der Therapiegruppe festgestellt. ....	30
Abbildung 3-4: Effekte von Citicolin auf die Infarkt volumina in der Toluidinfärbung. In der Therapiegruppe ergab sich keine signifikante Reduktion des Infarktvolumens im Vergleich zu Kontrollgruppe ( $p = 0,154$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit $p$ -Wert $< 0,05$ . ....	31
Abbildung 3-5: BrdU-Färbung im Bereich des <i>Gyrus dentatus</i> . Die Behandlung mit Citicolin führte zu signifikant höherer Zahl der BrdU-positiven Zellen im DG des Hippokampus ( $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit $p$ -Wert $< 0,05$ .....	32

- Abbildung 3-6: Prozentualer Anteil der neugebildeten Neuronen im *Gyrus dentatus* des Hippokampus. Die Behandlung mit Citicolin führte zu einem signifikant höheren Anteil der gleichzeitig BrdU- und NeuN-positiven Zellen ( $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit p-Wert  $< 0,05$ . .....32
- Abbildung 3-7: Die absolute Zahl der neugebildeten Neuronen im *Gyrus dentatus* des Hippokampus. In der Therapiegruppe war die Anzahl der doppelpositiven (BrdU- und NeuN-positiv) Zellen im *Gyrus dentatus* des Hippokampus signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit p-Wert  $< 0,05$ . .....33
- Abbildung 3-8: Zahl der BrdU-positiven Zellen in der Subventrikulärzone. In der Therapiegruppe war die Zahl der BrdU-positiven Zellen signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit p-Wert  $< 0,05$ . .....34
- Abbildung 3-9: Prozentualer Anteil der doppelpositiven Zellen (BrdU- und NeuN-positiv) in der Subventrikulärzone. Die Behandlung mit Citicolin führte zu einem signifikant höheren Anteil der BrdU- und NeuN-doppelpositiven Zellen ( $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit p-Wert  $< 0,05$ . .....34
- Abbildung 3-10: Die Zahl der doppelpositiven (BrdU- und NeuN-positiv) Zellen in der Subventrikulärzone. Die absolute Zahl der Neuronen war in der Therapiegruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student's t-Test: signifikanter Effekt mit p-Wert  $< 0,05$ . .....35
- Abbildung 3-11: Immunhistochemische Kombinationsfärbung von BrdU und NeuN. Aufnahme der Peri-Infarktregion unter Citicolintherapie. BrdU-positive Zellen leuchten rot. Die NeuN-positive Zellen leuchten grün (Pfeil; links: NeuN, mitte: BrdU, rechts: doppelpositive Zellen). Maßstab 100  $\mu\text{m}$ . .....36

---

Abbildung 3-12: Beurteilung der Migration der neuronalen Vorläuferzellen (DCX-positiven Zellen) nach kortikaler Ischämie unter Therapie mit Citicolin. Aufnahme der postischämischen Hirnläsion 28 Tage nach Ischämie (links). Vergrößerung (rechts). Maßstab entspricht 120  $\mu\text{m}$ . .....36

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AB	<i>Arteria basilaris</i>
ACA	<i>Arteria cerebri anterior</i>
ACI	<i>Arteria carotis internal</i>
ACM	<i>Arteria cerebri media</i>
ACP	<i>Arteria cerebri posterior</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AV	<i>Arteria vertebralis</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BrdU	Bromodeoxyuridin
CDP	<i>Cytidine diphosphate</i>
CMP	<i>Cytidine monophosphate</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCX	<i>Doublecortin</i>
DG	<i>Gyrus dentatus</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EPO	Erythropoietin
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NeuN	<i>Neuronal Nuclei</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
PBS	Phosphatgepufferter Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
rt-PA	<i>Recombinant tissue plasminogen activator</i>
SEM	<i>The standard error of the mean</i>
SSC	Natriumchlorid und Natriumcitrat
SVZ	Subventrikuläre Zone
TCS	<i>Tissue cryoprotectant solution</i>
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

## 8 Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. Jens Minnerup für die Vergabe des interessanten Themas, das mich immer fasziniert und motiviert hat, für die unkomplizierte und effektive Unterstützung und für die kontinuierliche und in jeder Hinsicht hervorragende Betreuung, von der Planung und fortwährenden Evaluation der Laborarbeit bis zur Hilfe beim Schreiben der Dissertation.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Kai Diederich, der mich in die Arbeit im Labor und im Stereologieraum eingeführt hat und mich auch darüber hinaus immer gerne mit fachkundigem Wissen unterstützt hat.

Ich danke den freundlichen und hilfsbereiten Mitarbeitern im Neurologie Labor, denen es gelungen ist, eine Arbeitsatmosphäre zu schaffen, die mich gerne im Labor arbeiten ließ.

Ich danke meinem Mann und meinen Eltern, ohne Ihre liebevolle Fürsorge und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zu dem Werk geworden, das sie heute ist.

## **9 Lebenslauf**

## 10 Anhang

24-02.04.2011. A 156

Landesamt für Natur,  
Umwelt und Verbraucherschutz  
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn  
Dr. Jens Minnerup  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
Universitätsklinikum Münster  
Albert-Schweitzer-Str. 33  
48129 Münster

**Tierversuchsvorhaben;**

Genehmigung gem. § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz in der Bekanntmachung der Neufassung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206) in der z.Zt. gültigen Fassung

Ihr Antrag vom 11.04.2011; Schreiben vom 30.11.2011

Sehr geehrter Herr Dr. Minnerup,

auf Grund des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) erteile ich Ihnen unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Tierversuches

**„Cholinerge Therapien zur Behandlung der "post-stroke-Demenz" - Untersuchungen der Wirksamkeit und der Mechanismen in zwei Tiermodellen“.**

Ihrem Genehmigungsantrag entsprechend obliegt die Verantwortung für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens folgenden Personen:

**Verantwortlicher Leiter: Dr. med. Jens Minnerup**  
**Stellvertretender Leiter: Dr. rer. nat. Kai Diederich**

Diese Genehmigung ist für die Dauer von **36** Monaten ab dem 28.12.2011 befristet bis zum

**31.12.2014.**

Auskunft erteilt:

Herr Skoff

Direktwahl 02361-305-3478

Fax 02361/305-3439

[fachbereich84@lanuv.nrw.de](mailto:fachbereich84@lanuv.nrw.de)

Aktenzeichen

84-02.04.2011.A156

bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:

Ihr Aktenzeichen:

Datum: 28.12.2011

Hauptsitz:

Leibnizstraße 10

45659 Recklinghausen

Telefon 02361 305-0

Fax 02361 305-3215

[poststelle@lanuv.nrw.de](mailto:poststelle@lanuv.nrw.de)

[www.lanuv.nrw.de](http://www.lanuv.nrw.de)

Dienstgebäude:

Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:

Ab Recklinghausen Hbf mit

Buslinie 236 bis Haltestelle

"Siemensstraße" und 5 Min.

Fußweg oder mit Buslinie SB 20

bis Haltestelle "Hohenhorster

Weg" und 15 Min. Fußweg in

Richtung Trabrennbahn bis

Leibnizstraße

Bankverbindung:

Landeskasse Düsseldorf

Konto-Nr.: 41 000 12

West LB AG

(BLZ 300 500 00)

BIC-Code: WELADED

IBAN-Code: DE 41 3005

0000 0004 1000 12