

Aus der Klinik für Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Evaluation des therapeutischen
Potentials von intravenös appliziertem
Metallothionein-II im Schlaganfall
Modell der Maus unter Thrombolyse**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Manuel Khajehalichalehshtari

aus

Freiburg

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in: Prof. Dr. med. G. Trendelenburg
Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. A. Schaper

Datum der mündlichen Prüfung: 09.04.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel

"Evaluation des therapeutischen Potentials von intravenös appliziertem Metallothionein-II im Schlaganfall Modell der Maus unter Thrombolyse"

eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 08.10.2023

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Eidizadeh A*, **Khajehalichalehshtari M***, Freyer D, Trendelenburg G (2015): Assessment of the Therapeutic Potential of Metallothionein-II Application in Focal Cerebral Ischemia In Vitro and In Vivo. PloS One 10, e0144035

*geteilte Erstautorschaft

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Abbildungsverzeichnis | III |
| Tabellenverzeichnis | IV |
| Abkürzungsverzeichnis..... | V |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Zerebrale Ischämie..... | 1 |
| 1.2 Pathophysiologie des Schlaganfalls..... | 1 |
| 1.2.1 Exzitotoxizität..... | 2 |
| 1.2.2 Periinfarktdepolarisation | 3 |
| 1.2.3 Apoptose..... | 3 |
| 1.2.4 Inflammation..... | 4 |
| 1.3 Alteplase der rekombinante gewebespezifische Plasminogenaktivator im Schlaganfall | 5 |
| 1.3.1 Klinische Anwendung von rtPA..... | 5 |
| 1.3.2 Wirkmechanismus tPA bzw. rtPA..... | 6 |
| 1.3.3 Gewebespezifischer Plasminogenaktivator neurotoxisch oder neuroprotektiv? | 6 |
| 1.4 Metallothionein..... | 8 |
| 1.4.1 Eigenschaften und Fähigkeiten von Metallothionein..... | 8 |
| 1.4.2 Neuroprotektion von Metallothionein bei zerebraler Ischämie | 10 |
| 1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit..... | 12 |
| 2 Material und Methoden | 13 |
| 2.1 Materialien | 13 |
| 2.1.1 Antikörper und Proteine | 13 |
| 2.1.2 Medikamente, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien..... | 13 |
| 2.1.3 Chirurgisches Instrumentarium und Nahtmaterial | 15 |
| 2.1.4 Geräte..... | 16 |
| 2.1.5 Software | 16 |
| 2.1.6 Versuchstiere..... | 17 |
| 2.2 Methoden..... | 18 |
| 2.2.1 Tierhaltung, allgemeine Versuchsanordnung, Randomisierung..... | 18 |
| 2.2.2 Modell der transienten fokalen zerebralen Ischämie | 19 |
| 2.2.3 Intravenöse Applikation und Dosierungen..... | 20 |
| 2.2.4 Neurologische Scores | 21 |
| 2.2.5 Perfusion, Präparation der Gewebe | 23 |
| 2.2.6 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung und Infarktmetrie | 23 |
| 2.2.7 Präparation Schnitte für Immunhistochemie und Immunhistochemie..... | 24 |
| 2.2.8 Digitalisierung der histologischen Präparate..... | 24 |
| 2.2.9 Zellzahlbestimmung..... | 25 |
| 2.2.10 Statistische Auswertung..... | 26 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3 | Ergebnisse | 27 |
| 3.1 | Physiologische Parameter..... | 27 |
| 3.1.1 | Körpergewicht | 27 |
| 3.1.2 | Körpertemperatur | 28 |
| 3.2 | Neuro-Scoring..... | 29 |
| 3.2.1 | Bederson Score | 29 |
| 3.2.2 | <i>Modified Neurological Severity Score (mNSS)</i> | 30 |
| 3.3 | Infarktvolumetrie..... | 31 |
| 3.3.1 | Direktes Infarktvolumen..... | 31 |
| 3.3.2 | Indirektes Infarktvolumen | 32 |
| 3.3.3 | Ödematöse Schwellung | 33 |
| 3.4 | Immunhistochemie | 34 |
| 3.4.1 | NeuN - positive Zellen..... | 35 |
| 3.4.2 | Iba1 - positive Zellen..... | 36 |
| 3.5 | Mortalität..... | 37 |
| 4 | Diskussion | 38 |
| 4.1 | Methodik..... | 38 |
| 4.1.1 | Das Tiermodell (MCAO)..... | 38 |
| 4.1.2 | Intravenöse Applikation..... | 39 |
| 4.1.3 | Neuroprotektive Faktoren im Versuch..... | 40 |
| 4.1.4 | Neuroscores | 41 |
| 4.2 | Ergebnis | 41 |
| 4.2.1 | Effekt von rtPA..... | 41 |
| 4.2.2 | Neuroprotektives Potential von Metallothionein II (MT-II) | 43 |
| 4.2.3 | Kombinierte Gabe von rtPA und MT-II | 45 |
| 4.3 | Schlussfolgerung und Relevanz der Ergebnisse | 48 |
| 5 | Zusammenfassung | 49 |
| 6 | Anhang | 50 |
| 6.1 | Bestätigung der fachlichen Eignung..... | 50 |
| 6.2 | Zertifikat Versuchstierkunde | 51 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 52 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Kaskade schädigender Ereignisse bei fokaler zerebraler Ischämie | 2 |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gefäßversorgung und MCAO..... | 20 |
| Abbildung 3: TTC-Färbung und Infarktmetrie | 23 |
| Abbildung 4: NeuN/DAPI-Färbung mit Kästen | 25 |
| Abbildung 5: Iba1- Färbung | 26 |
| Abbildung 6: Verlaufskurve des Körpergewichts..... | 27 |
| Abbildung 7: Verlaufskurve der Körpertemperatur | 28 |
| Abbildung 8: Ergebnis Bederson-Score..... | 29 |
| Abbildung 9: Ergebnis mNSS Score | 30 |
| Abbildung 10: Direktes Infarktvolumen..... | 31 |
| Abbildung 11: Indirektes Infarktvolumen..... | 32 |
| Abbildung 12: Ödematöse Schwellung..... | 33 |
| Abbildung 13: Immunhistochemische Darstellung | 34 |
| Abbildung 14: NeuN - positive Zellen..... | 35 |
| Abbildung 15: Iba1 - positive Zellen..... | 36 |
| Abbildung 16: Überlebenskurve..... | 37 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Antikörper und Proteine..... | 13 |
| Tabelle 2: Medikamente, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien | 13 |
| Tabelle 3: Chirurgisches Instrumentarium und Nahtmaterial..... | 15 |
| Tabelle 4: Geräte..... | 16 |
| Tabelle 5: Software..... | 16 |
| Tabelle 6: Versuchstiere..... | 17 |
| Tabelle 7: Mortalität und Komplikationen..... | 18 |
| Tabelle 8: Bederson-Score..... | 21 |
| Tabelle 9: <i>Modified Neurological Severity Score</i> | 22 |
| Tabelle 10: Ergebnis Bederson-Score | 29 |
| Tabelle 11: Ergebnis mNSS Score..... | 30 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| AMPA | α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure |
| AP | Aktivatorprotein |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BDNF | Brain-Derived Neurotrophic Factor |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke |
| Cy | Cyanin |
| DAMP | <i>damage associated molecular pattern</i> |
| DAPI | 4',6'-Diamidino-2-phenylindol |
| dH ₂ O | Deionisiertes Wasser |
| GDNF | <i>glial cell derived neurotrophic factor</i> |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| Iba | <i>Ionized calcium-binding adapter molecule</i> |
| IL | Interleukin |
| LRP1 | <i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1</i> |
| MCAO | <i>middle cerebral artery occlusion</i> |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| mNSS | <i>modified Neurological Severity Score</i> |
| MT | Metallothionein |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NeuN | <i>Neuron-specific nuclear antigen</i> |
| NF- κ B | <i>Nuclear Factor Kappa B</i> |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| OGD | <i>Oxygen-glucose deprivation</i> |
| PAI | Plasminogenaktivator-Inhibitor |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| RAGE | <i>receptor for advanced glycation endproducts</i> |
| ROS | <i>reactive oxygen species</i> |
| rtPA | <i>recombinant tissue-type plasminogen activator</i> |
| SEM | <i>Standard Error of the Mean</i> |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> |
| TGF | <i>transforming growth factor</i> |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TTC | 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid |
| TVA | Tierversuchsantrag |
| Zn | Zink |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1 Einleitung

1.1 Zerebrale Ischämie

Der Schlaganfall ist nach der koronaren Herzkrankheit die zweithäufigste Todesursache weltweit und der dritthäufigste Grund für eine erworbene Behinderung. Es zeigt sich ein stetiger Anstieg der Fallzahlen im Zeitraum von 1990-2019 (Feigin et al. 2021). Der Schlaganfall wird als eine sich rasch entwickelnde fokale oder globale Störung der Hirnfunktion, welche mindestens 24 Stunden andauert oder zum Tod führt, definiert, wobei nicht vaskuläre Ursachen ausgeschlossen sein müssen (Hatano 1976).

Es wird zwischen einer ischämischen und einer hämorrhagischen Genese unterschieden. Der Anteil der ischämischen Schlaganfälle im Jahre 2019 lag bei 62,4 % weltweit und ist somit die häufigste Ursache (Feigin et al. 2021). Der ischämische Schlaganfall verursacht durch die Unterbindung oder Drosselung des Blutflusses eines Gefäßstromgebietes eine Minderperfusion der betroffenen Gehirnregionen, der damit verbundene Zelluntergang führt zu zum Teil drastischen neurologischen Beeinträchtigungen für den Patienten (Dirnagl et al. 1999).

Die Therapiemöglichkeiten sind bis heute begrenzt. Neben der Thrombolyse mittels rekombinantem gewebespezifischem Plasminogenaktivator (rtPA) ist seit 2008 die mechanische Thrombektomie Teil des Therapieregimes (Turc et al. 2019).

Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit dem ischämischen Schlaganfall und potenzieller medikamentöser Therapieansätze.

1.2 Pathophysiologie des Schlaganfalls

Eine zerebrale Ischämie verursacht eine Kettenreaktion von komplexen pathophysiologischen Mechanismen, die zu einer Funktionsstörung und schließlich zum Untergang von neuronalen Zellen führt. Die hohe metabolische Aktivität des Gehirns verursacht bei fehlender Blutzufuhr eine rasche Gewebsschädigung (Moskowitz et al. 2010). Die Gewebsschädigung lässt sich in verschiedene, sich teils überschneidende, Phasen unterteilen. Wie in Abbildung 1 dargestellt, beginnt es mit der Exzitotoxizität und der Periinfarktdepolarisation gefolgt von der Inflammation und der Apoptose (Dirnagl et al. 1999). Der Infarkt lässt sich in zwei unterschiedliche Lokalisationen unterteilen, zum einen das Kernzentrum des Infarkts und zum anderen die *Penumbra* (lateinisch: Halbschatten) (Astrup et al. 1981). Es lassen sich

unterschiedliche pathogene Vorgänge in den beiden Bereichen beobachten (González 2006). Im Bereich des Kernzentrum kommt es innerhalb von Minuten zu Exzitotoxizität und zur Nekrose, da die fehlende Blutzufuhr zu einem Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen führt. Die *Penumbra*, das Kernzentrum umgebende Gewebe, kann aufgrund von Kollateralgefäßen die mangelnde Blutzufuhr bedingt kompensieren. Das Gewebe der *Penumbra* gilt als funktionell eingeschränkt, allerdings strukturell nicht bzw. noch nicht geschädigt. Die Reperfusion entscheidet über die Regeneration der *Penumbra* und ist somit Therapieziel für ein besseres *Outcome* (Dirnagl et al. 1999). Allerdings muss auch die Reperfusion kritisch betrachtet werden, da es hierbei zum Einschwemmen von Entzündungszellen kommt und dies häufig mit Gewebsschäden einhergeht (Sun et al. 2018).

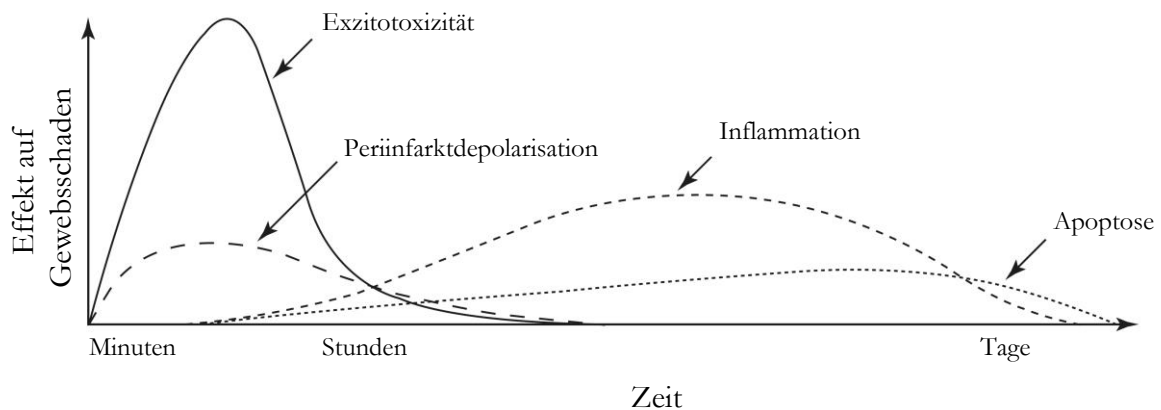


Abbildung 1: Kaskade schädigender Ereignisse bei fokaler zerebraler Ischämie übersetzt aus (Dirnagl et al. 1999) (Erlaubnis zur Nutzung in deutscher Sprache durch Elsevier-Verlag erteilt)

1.2.1 Exzitotoxizität

Exzitotoxizität ist ein pathophysiologischer Prozess, der bei vielen neurologischen Erkrankungen eine Rolle spielt. Neben der zerebralen Ischämie ist Exzitotoxizität z.B. beim Schädelhirntrauma, bei Intoxikationen, aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Multiple Sklerose oder Amyotrophe Lateralsklerose zu beobachten. Das Gehirn ist bei der Energiegewinnung fast ausschließlich auf die oxidative Phosphorylierung angewiesen. Bei der zerebralen Ischämie führt die unzureichende Sauerstoff- und Glukoseversorgung zum Ausfall der Adenosintriphosphat-Synthese (ATP-Synthese). Der ATP-Mangel in der Zelle führt zu einer Funktionsstörung der Natrium-Kalium-ATPase-Pumpe, was zu einem Elektrolytungleichgewicht und zur Depolarisation der neuronalen Plasmamembran führt. Es kommt zu einem Kaliumausstrom und einem Natrium- und Kalziumeinstrom in

die Zellen (Dirnagl et al. 1999). Der Kalziumeinstrom triggert die Freisetzung von Glutamat, was eine Überaktivierung der Glutamatrezeptoren zur Folge hat (Benveniste et al. 1984). Über die N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) kommt es zu einer Steigerung des Kalziumeinstroms in die Zelle (MacDermott et al. 1986). Die Potenzierung der intrazellulären Kalziumkonzentration löst daraufhin den apoptotischen Zelltod aus. Die Überaktivierung des Glutamat-abhängigen α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolpropionsäure-Rezeptors (AMPA-Rezeptors) führt zu einem intrazellulären Einstrom von Natrium und Chloridionen, was einen passiven Flüssigkeitseinstrom in die Zelle begünstigt. Infolgedessen entsteht bei der zerebralen Ischämie eine ödematöse Schwellung des Gehirns, welche die *Herniation* (Einklemmung des Gehirns) verursachen kann und somit das neurologische *Outcome* und das Überleben des Patienten stark beeinflusst (Dirnagl et al. 1999).

1.2.2 Periinfarktdepolarisation

Der transiente extrazelluläre Kaliumanstieg führt zu einer Depolarisation der Zellen des gesamten Infarktgebietes. Im Bereich der *Penumbra* werden diese als Periinfarktdepolarisationen bezeichnet. Die Fähigkeit der Repolarisation ist direkt von der Perfusion des Gewebes abhängig. Die Zellen der *Penumbra* können, im Gegensatz zum Kernzentrum des Infarktes, repolarisieren. Allerdings ist aufgrund der eingeschränkten Perfusion die Kompensationsfähigkeit schnell ausgereizt, dies mündet bei fehlenden Energiereserven in einer anoxischen Depolarisation des Periinfarktgewebes. Es kommt zur Demarkierung und somit zur sekundären Vergrößerung des Infarkts (Iijima et al. 1992; Mies et al. 1993; Hossmann 1996).

1.2.3 Apoptose

Bei der zerebralen Ischämie kann es sowohl durch Nekrose als auch durch Apoptose zum Zelltod kommen. Die Prozesse werden durch das Ausmaß des Infarkts, durch den Zelltyp und die Lokalisation der Zellen bestimmt (Leist und Nicotera 1998). Während im Kernzentrum des Infarkts die Nekrose vorherrscht, spielt die Apoptose die maßgebliche Rolle in der *Penumbra*. Die Zellen der *Penumbra* können aufgrund der bestehenden Restperfusion und der Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels kontrolliert die Apoptose einleiten (Linnik et al. 1995; González 2006). Oxidativer Stress, insbesondere durch Sauerstoffradikale, *Deoxyribonucleic acid*-Schäden (DNA-Schäden) und Schäden an der Mitochondrienmembran führen zur Freisetzung von Cytochrom C, welches die intrinsische apoptotische Kaskade aktiviert (Fujimura et al. 1998; Dirnagl et al. 1999). Die extrinsische Signalkaskade wird über den FAS-Rezeptor durch Zytokine wie beispielsweise Tumornekrosefaktor α

(TNF α) aktiviert (Iadecola und Anrather 2011). Es kommt über beide Wege zur Aktivierung zahlreicher Caspasen, die die kontrollierte Apoptose auslösen (Dirnagl et al. 1999).

1.2.4 Inflammation

Die Inflammation, bzw. die Entzündungsreaktion, scheint sowohl für das zerebrale postischämische Verletzungsmuster als auch bei der Heilung und den postischämischen Reparaturmechanismen eine maßgebliche Rolle zu spielen (Dirnagl et al. 1999).

Die Entzündungsreaktion kann nicht nur lokale, sondern auch systemische Auswirkungen mit sich bringen. So kann der Infarkt eine systemischen Immundepression triggern, wodurch Infektionsgeschehen mit einem Anstieg der Letalität begünstigt werden (Simats und Liesz 2022).

Die Inflammation ist zunächst die Aktivierung des angeborenen Immunsystems des Gehirns als Reaktion auf einen Reiz, wie z. B. die zerebrale Ischämie. Beteiligt sind Immunzellen, Blutgefäße und molekulare Mediatoren (Jurcau und Simion 2022). Die Inflammationskaskade beginnt wenige Stunden nach der zerebralen Ischämie und kann mehrere Tage andauern (Schaeffer und Iadecola 2021). Mit der Bekämpfung der Ursache soll der Schaden möglichst gering gehalten werden, dabei werden die vitalen Zellen geschützt, Zelltrümmer beseitigt und Reparaturmechanismen aktiviert (DiSabato et al. 2016).

Auslösend für die Inflammation sind nekrotische Zellen bzw. Zellbestandteile, indem sie Moleküle, sogenannte *damage associated molecular patterns* (DAMPs), in ihre Umgebung freisetzen. Dies führt zur Aktivierung der Mikrogliazellen, der Endothelzellen der zerebralen Gefäße, der Astrozyten und in späteren Stadien auch der infiltrierenden Leukozyten. Über Rezeptoren, wie z.B. *Toll-like-receptor 2* (TLR2), TLR4 und *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE), folgt die Stimulation des Transkriptionsfaktors *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B). Dieser Faktor steuert die Expression von Genen, die für proinflammatorische Moleküle kodieren, darunter *Interleukin-1 β* (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-18 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Außerdem stimuliert der Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivatorprotein 1) die Expression von IL-1 und TNF- α und einiger Adhäsionsmoleküle (Offner et al. 2006; Iadecola und Anrather 2011). Die Mikroglia wechselt, unter Einfluss der Zytokine, aus ihrem Ruhephänotyp in den aktivierten amöboiden M1-Typ, was zu einer Stimulation der Proliferation führt (Tang und Le 2016). Neben der Steigerung der Produktion von *reactive oxygen species* (ROS), erlangt der M1-Typ die Fähigkeit zur Zellwanderung und Phagozytose. Die Aktivierung der Mikroglia gilt als eine der ersten entzündlichen Veränderung (Stevens et al. 2002). Es folgt die Einwanderung von Leukozyten in das geschädigte Gewebe (Ross et al. 2007). Diese ist abhängig von den Zytokinen, Chemokinen und

Adhäsionsmolekülen der Endothelzellen und verläuft in mehreren Phasen. Als erste Leukozyten infiltrieren neutrophile Granulozyten das Gewebe. Anschließend folgen Monozyten und Makrophagen und im weiteren Verlauf T-Lymphozyten als Vertreter der erworbenen Immunabwehr (Gelderblom et al. 2009). Die Infiltration von Leukozyten aus dem Blut dauert mehrere Wochen an. Insbesondere neutrophile Granulozyten und Makrophagen setzen große Mengen an Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-9, MMP-13) frei (Rosenberg 2002). Diese Enzyme haben neurotoxische Eigenschaften und zerstören die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS), dies kann zu einer hämorrhagischen Transformation, einer Einblutung ins Infarktareal, führen. Infolgedessen ist die Therapiemöglichkeit mit rtPA bzw. die mechanische Thrombektomie limitiert. Zudem wird durch die erhöhte Permeabilität der BHS die Ödembildung mit den verbundenen Risiken begünstigt (Sun et al. 2018).

Der Entzündungsprozess wird häufig als zweischneidiges Schwert in der Literatur beschrieben, da die Inflammation sowohl eine positive als auch eine negative Rolle übernimmt. Während die Anfangsphase zu einer Vergrößerung des Infarkts führt, spielt z.B. die Phagozytose geschädigter Neurone eine positive Rolle. So kann insbesondere die aktivierte Mikroglia (M2-Typ) durch das Freisetzen von *transforming growth factor beta 1* (TGF-beta1), *glial cell derived neurotrophic factor* (GDNF) und des entzündungshemmenden IL-10 eine protektive und reparierende Rolle in der Wiederherstellung der Gewebemöiostase spielen (Moskowitz et al. 2010).

1.3 Alteplase der rekombinante gewebespezifische Plasminogenaktivator (rtPA) im Schlaganfall

1.3.1 Klinische Anwendung von rtPA

Alteplase, der rekombinante gewebespezifische Plasminogenaktivator (rtPA), wurde Mitte der 1990er Jahre etabliert und ist bis heute die einzige medikamentöse Therapie der akuten zerebralen Ischämie (Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke 1995). Die Gabe erfolgt gewichtsadaptiert, d.h. 0,9 mg/kg Körpergewicht (KG) bis zu einer Höchstdosis von 90 mg. Nach einem initialen intravenösen Bolus von 10 % der Gesamtdosis, erfolgt die weitere Applikation kontinuierlich intravenös über 1 h. Die Dosis von 0,9 mg/kg KG wird regelmäßig kritisch diskutiert, da die Hämorrhagie als Nebenwirkung nicht außer Acht zu lassen ist. Die Therapie mit rtPA ist auf ein Zeitfenster von 4,5 h begrenzt, sodass ein schnelles Handeln bei infarkttypischer Symptomatik unerlässlich ist (Ringleb et al. 2022). Die verzögerte Gabe birgt das Risiko von Ödemen und hämorrhagischer Transformation, dies

zeigte sich sowohl in experimentellen Tiermodellen als auch bei Patienten mit zerebraler Ischämie (Feigin et al. 2021). Je nach bildmorphologischer Darstellung des Infarkts kann eine Gabe nach der aktuellen Leitlinie trotzdem bis zu 9 h sinnvoll sein und somit außerhalb des definierten Zeitfensters liegen (Ringleb et al. 2022).

1.3.2 Wirkmechanismus tPA bzw. rtPA

Der gewebspezifische Plasminogenaktivator (tPA) ist eine endogene Serinprotease, welche sowohl in Endothelzellen als auch in Neuronen vorkommt. Er besteht aus fünf Domänen, die für die unterschiedlichen Funktionen des Moleküls verantwortlich sind.

Die bekannteste Aufgabe ist die Fibrinolyse. Durch das Spalten von Plasminogen zu Plasmin nimmt tPA eine entscheidende Rolle in der Gerinnungskaskade ein (Hoylaerts et al. 1982). Im Gehirn hingegen wird tPA mit mehreren physiologischen als auch pathologischen Ereignissen in Verbindung gebracht. Der gewebspezifische Plasminogenaktivator wird am neuronalen Wachstumskegel freigesetzt (Krystosek und Seeds 1981) und beeinflusst die neuronale Migration (Seeds et al. 1999), sowie das Auswachsen und den Umbau von Neuriten während der embryonalen Entwicklung (Lee et al. 2014). In *in vitro* und *in vivo* Modellen zeigte sich der Einfluss auf die Entwicklung der synaptischen Plastizität, das Lernen, die stressinduzierte Angst und die Plastizität der Sehrinde (Yepes 2015).

1.3.3 Gewebespezifischer Plasminogenaktivator neurotoxisch oder neuroprotektiv?

Die Rolle von tPA in der zerebralen Ischämie wird bis heute kontrovers diskutiert. Lange Zeit dominierte die Meinung der Neurotoxizität. Dies änderte sich als mehrere Arbeitsgruppen eine neuroprotektive Wirkung zeigen konnten (Yepes 2015).

1.3.3.1 Neurotoxizität

Es wurde festgestellt, dass endogenes tPA bei der zerebralen Ischämie die Freisetzung von Glutaminsäure, die Infiltration von Leukozyten, die Aktivierung von Mikroglia und die Produktion freier Radikale steigert (Zhang et al. 2009a; Zhang et al. 2009b; Macrez et al. 2016).

Durch die Stimulation von NMDA- und AMPA-Rezeptoren kann tPA die Glutaminsäurefreisetzung erhöhen und so scheint tPA die Exzitotoxizität während eines Schlaganfalls beeinflussen zu können (Lopez-Atalaya et al. 2008; Jeanneret et al. 2016). Neurone konnten durch induzierten tPA-Mangel bzw. tPA-Inhibitoren vor Exzitotoxizität geschützt werden (Tsirka et al. 1995; Lebeurrier et al. 2005). Zudem kann tPA die Expression von Matrix-

Metalloproteasen (MMPs) steigern. Insbesondere MMP-9 kann durch die Interaktion mit *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1*-Rezeptoren (LRP-1-Rezeptoren) der Mikroglia stimuliert werden und damit zu einer Steigerung der Permeabilität der BHS führen (Zhang et al. 2009a; Wu et al. 2013).

Gewebsspezifischer Plasminogenaktivator lässt sich mittels tPA-Inhibitoren hemmen. Zu den natürlichen tPA-Inhibitoren gehören die Plasminogenaktivator-Inhibitoren 1 und 2 (PAI-1 und PAI-2), wobei PAI-2 hauptsächlich in der Plazenta vorkommt und somit PAI-1 als der wichtigste Inhibitor von tPA im adulten menschlichen Körper gilt (Kawano et al. 1968; Sprengers und Kluft 1987). Im Tierversuch zeigten PAI-1-defiziente Mäuse größere ischämische Infarkte im Vergleich zur Wildtyp Kontrollgruppe (Nagai et al. 1999).

Auch bei der Inflammation scheint tPA eine Rolle zu spielen, so kann es die Polarisierung von Mikroglia in den M1- bzw. M2-Typ beeinflussen. (Won et al. 2015). So zeigten tPA-Inhibitor-defiziente Mäuse bei zerebraler Ischämie mehr aktivierte M1-Mikroglia-Zellen und ein größeres Infarktvolumen (Gelderblom et al. 2013). Demgegenüber zeigten tPA-defiziente Mäuse kleinere Infarktvolumina als die Kontrollgruppe der Wildtyp-Mäuse (Abe et al. 2003).

Es scheint als würden die beschriebenen Studien die Neurotoxizität und die proinflammatorische Komponente beweisen. Allerdings dürfen die zahlreichen Studien, die eine Neuprotektion belegen bei der Beleuchtung der Thematik nicht außer Acht gelassen werden.

1.3.3.2 Neuroprotektion

Endogenes tPA ist durch seine Rolle in der Blutgerinnung mitverantwortlich für eine ungestörte Blutversorgung des zentralen Nervensystems (ZNS). Es ist für das Überleben der Neurone unerlässlich (Collen 2001).

In vitro Studien zeigten, dass tPA das Überleben von Neuronen im Sauerstoff-Glukose-Deprivation-Modell (OGD) nicht beeinträchtigt und die Vorbehandlung mit tPA die Neurone sogar schützt (Echeverry et al. 2010; Haile et al. 2012). Die tPA induzierte Exzitotoxizität ist dosisabhängig und tritt nur bei hohen tPA-Konzentrationen auf (Wu et al. 2013). Niedrige Konzentrationen scheinen sogar eine protektive Wirkung zu erzielen (Bertrand et al. 2015). Transgene Mäuse mit überexprimiertem tPA zeigten kleinere Läsionen als die Kontrollgruppe der Wildtyp-Mäuse (Wu et al. 2012).

Der *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) ist ein trophisches Protein, welches das Überleben von Neuronen bei verschiedenen Verletzungen und Pathologien, einschließlich

Exzitotoxizität, fördert (Lu et al. 2013). Es hat sich gezeigt, dass tPA die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin an der astrozytären Plasmamembran katalysiert und Plasmin pro-BDNF in BDNF spalten kann (Pang et al. 2004).

Aufgrund des bestehenden Diskurses beschäftigen wir uns in dieser Arbeit mit rtPA und der Frage, ob eine neurotoxische oder neuroprotektive Wirkung vorherrscht.

1.4 Metallothionein

1.4.1 Eigenschaften und Fähigkeiten von Metallothionein

Metallothioneine (MTs) wurden erstmalig 1957 als cadmiumbindende Proteine in der Niere von Pferden entdeckt (Margoshes und Vallee 1957). Sie haben mit 6-7 kDa ein kleines Molekulargewicht. Sie zeichnen sich durch einen hohen Anteil von Cystein (ca. 30 %) und das Fehlen von aromatischen Aminosäuren aus. Metallothioneine zeigen eine hohe Affinität für zweiwertige Metalle wie Zink, Cadmium und Kupfer (Robbins et al. 1991). Es können vier humane Hauptisoformen unterschieden werden (MT-I - MT-IV). MTs kommen in allen Eukaryonten sowie in einzelnen Prokaryonten vor (Shinji et al. 1993).

Obwohl seit mehreren Jahrzehnten Metallothionein Bestandteil der Forschung ist, sind die biologischen Fähigkeiten bis heute nicht vollständig entschlüsselt.

Aufgrund der hohen Affinität zu essenziellen Metallen war zunächst die Schwermetallentgiftung das Hauptaugenmerk der Forschung (Nordberg et al. 1971). Erkrankungen, die den Metallstoffwechsel stören, wie z.B. die Itai-Itai-Krankheit, die Menkes-Krankheit oder der Morbus Wilson, scheinen eng mit Metallothionein verknüpft zu sein (Kelly und Palmiter 1996; Baba et al. 2013; Nakazato et al. 2014).

Die mittlerweile nachgewiesene Beteiligung in zellulären Prozessen wie Antioxidation, Proliferation, Migration und Apoptose stehen heutzutage im Interesse der Forschenden (Hübner und Haase 2021; Monteith et al. 2021).

Die Promotorregionen der MT-I-/II-Gene können durch Stresshormone (z. B. Glucocorticoide und Katecholamine) und proinflammatorische Zytokine (z. B. IL1- β , IL6, TNF- α) über den *Januskinase-Signal Transducers and Activators of Transcription*-Signalweg (JAK-STAT-Signalweg) stimuliert werden. Zusätzlich können die Regionen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) über *antioxidative Response*-Elemente sowie von Metallionen, die an metallhaltige Transkriptionsfaktoren binden, aktiviert werden (Pedersen et al. 2009b).

Im ZNS werden MT-I/II hauptsächlich in Astrozyten und in geringerem Maße in Neuronen exprimiert. Metallothionein-I/II werden auch in Ependymzellen und in Mikroglia exprimiert (Pedersen et al. 2009a).

Das endogene sezernierte MT-I/II wird durch Neurone über den LRP-2 (Megalin) und den LRP-1-Rezeptor aufgenommen. Die MT-vermittelte Aktivierung des Megalin-Rezeptors führt zu einer intrazellulären Aktivierung von Transkriptionsfaktoren über den Phosphoinositid-3-Kinase-Weg und das *cAMP-Response-Element*-bindende Protein (CREP) (West et al. 2011). Die rezeptorvermittelte Wirkung von MT-I/II und die Wirkung als Modulator des intrazellulären Zinkspiegels bzw. als Antioxidans abzugrenzen, gestaltet sich zum aktuellen Zeitpunkt schwierig. Neben der Aussprossung von Neuriten, kann die Apoptose und die Inflammation zu einem gewissen Grad rezeptorvermittelt durch MT reguliert werden (Ambjørn et al. 2008; Chung et al. 2008; Asmussen et al. 2009b; Asmussen et al. 2009a). Zink und ROS sind wichtige Modulatoren der Apoptose. Zink kann im ZNS sowohl apoptotische als auch nekrotische Signalwege über z.B. Cytochrom c induzieren (Adamo et al. 2010; Lee und Koh 2010). Die Aktivierung von Mikroglia und die Astroglieose führen zur Stimulation von Leukozyten und einer verstärkten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und TNF- α . Hierbei kommt es zu einer vermehrten Bildung von ROS und somit zur Induktion von antioxidativen Enzymen wie beispielsweise MT (Inoue et al. 2009). Die Cysteinreste von MT führen zu einer antioxidativen Wirkung und somit zu einem Schutz vor ROS (Santos et al. 2012). Oxidativer Stress kann allerdings auch durch Zink getriggert werden, indem es die mitochondriale und extra-mitochondriale Produktion von ROS fördert (Vasto et al. 2008). Somit scheint es sich bei der antiinflammatorischen Wirkung von MT um eine Kombination aus der Regulierung des intrazellulären Zinkspiegels und der antioxidativen Eigenschaften zu handeln. Der Beitrag der rezeptorvermittelten Wirkung ist hier bislang nicht geklärt.

Metallothionein-II (MT-II) gilt als die wichtigste Isoform, die beim Menschen exprimiert wird (Hübner und Haase 2021). MT-II weist eine Sequenzidentität von bis zu 90 % mit MT-I auf, deshalb werden MT-I und MT-II häufig in ihren Fähigkeiten zusammengefasst (Ebadi et al. 1996). Trotzdem gibt es funktionelle Unterschiede. Im Gegensatz zu MT-I schützt die Injektion mit MT-II in einem Mausmodell der Autoimmun-Enzephalomyelitis vor der Demyelinisierung (Comes et al. 2019). MT-II scheint zudem eine wichtige Rolle bei entzündlichen Erkrankungen der Atemwege sowie bei Krebserkrankungen zu spielen (Inoue et al. 2005; Si und Lang 2018). So wird MT-II beispielsweise im hyperplastischen

Epithel von schlecht differenzierten Gebärmutterhalskarzinomen stark exprimiert, nicht jedoch in gut differenzierten Gebärmutterhalskarzinomen (Jakovac et al. 2021).

MT I/II Knockout Mäuse zeigen eine nahezu normale Entwicklung, allerdings weisen die Tiere fehlende Schutzmechanismen gegen Metalltoxizität und oxidativen Stress auf (Michalska und Choo 1993; Masters et al. 1994). Nach Verletzungen sind Reparaturmechanismen des ZNS eingeschränkt, dies führt zu persistierenden Einschränkungen der kognitiven Leistung (Santos et al. 2012).

Metallothionein scheint zudem bei entzündlichen neurologischen Erkrankungen wie der Amyotrophen Lateralsklerose, Alzheimer-Erkrankung und zerebralen Ischämie eine tragende Rolle zu spielen (Blaauwgeers et al. 1996; Hidalgo et al. 2001; Trendelenburg et al. 2002).

1.4.2 Neuroprotektion von Metallothionein bei zerebraler Ischämie

Die Grundlage für das Interesse unserer Arbeitsgruppe an MT-II war das Ergebnis der seriellen Genanalyse in einem Standardmodell für fokale zerebrale Ischämie bei Mäusen. Metallothionein-II war hier das am stärksten induzierte Gen nach 12 Stunden nach der Reperfusion (Trendelenburg et al. 2002). Dies implizierte eine wichtige Rolle in der Reperusionsphase und einen potenziellen therapeutischen Angriffspunkt.

In einem Sauerstoff-Glukose-Entzugsversuch (OGD) konnte der MT vermittelte Schutz von Isofluran-präkonditionierten Neuronen und Gliazellen *in vitro* gezeigt werden (Liu et al. 2020).

Im für unsere Arbeitsgruppe durchgeführten OGD konnten wir den Schutz durch exogenes MT-II nachweisen (Eidizadeh et al. 2015).

Durch (Penkowa und Moos 1995) wurden die ersten Nachweise für die neuroprotektiven und neuroregenerativen Fähigkeiten von MT-I/II geliefert. In den Versuchen mit MT-I/II Knockout Mäusen ließen sich nach Kryoläsion ein deutlich besseres Heilungsverhalten als bei der Kontrollgruppe erkennen (Penkowa et al. 1999). Allerdings gab es auch an verschiedenen Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Kritik, sodass die Ergebnisse mit einer gewissen Vorsicht zu interpretieren sind (Callaway 2012).

Andere Arbeitsgruppen konnten eine geringere neuronale Überlebensrate bei durch Kainensäure getriggerte Exzitotoxizität von MT-I/II Knockout Mäusen und nach MCAO im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen (Carrasco et al. 2000; Wakida et al. 2007).

Die neuroprotektive Fähigkeit von MT konnte durch MT-I transgenen Mäusen mit verringerten Infarkten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gezeigt werden (van Lookeren Campagne et al. 1999). Außerdem konnte der Versuch mit MT-I/II-Knock-out-Mäusen, die größere Infarkte im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen, bestätigt werden (Wakida et al. 2007).

Wird exogenes MT-II intraperitoneal appliziert, gelangt es bei Ratten nach 15-45 min in die extrazelluläre Matrix des ZNS und hat dort eine Wirkdauer von ca. 6-8 Stunden (Giralt et al. 2002). Bei einer intakten Blut-Hirn-Schranke (BHS) lässt sich dieser Effekt nicht beobachten, da exogenes Metallothionein diese nicht passieren kann (Lewis et al. 2012).

Es konnte eine neuroprotektive Wirkung mit der Verringerung des Infarktvolumens nach intraperitoneale Applikation von exogenem MT-II bei transienter MCAO bei Wistar Ratten bewiesen werden (Diaz-Ruiz et al. 2014).

1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Die medikamentöse Therapie des Schlaganfalls ist zum jetzigen Zeitpunkt auf rtPA beschränkt. Die Einleitung macht deutlich, dass die Komplexität der Vorgänge bei der zerebralen Ischämie zwar immer besser verstanden werden, allerdings bislang hieraus keine neue Therapieoptionen entstanden sind. Diese Arbeit soll mithilfe des Modells der transienten fokalen zerebralen Ischämie einen Aufschluss über das therapeutische Potential von intravenös appliziertem Metallothionein unter Thrombolyse mit und ohne rtPA geben.

Zusätzlich werden die Auswirkungen von der Applikation von rtPA genauer beleuchtet, um dem Diskurs zwischen Neuroprotektion und Neurotoxizität ein weiteres Kapitel hinzufügen zu können.

Die Auswertung erfolgt anhand der Neuroscores, der Infarktvolumina, der Zellzahlen und physiologischer Parameter.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper und Proteine

Tabelle 1: Antikörper und Proteine

| Produkt | Spezies | Hersteller | Nummer |
|---------------------------------------|-----------|-----------------------------|------------------|
| Monoklonale Primärantikörper | | | |
| Anti-Iba-1 | Kaninchen | Wako Chemicals, USA | 019-19741 |
| Anti-NeuN | Maus | Merck Millipore, USA | MAB377 |
| Polyklonale Sekundärantikörper | | | |
| Cy3 konjugiert <i>Anti-Rabbit</i> | Esel | Jackson Immuno, UK | 711-165-152 |
| Cy5 konjugiert <i>Anti-Mouse</i> | Esel | Jackson Immuno, UK | 715-175-150 |
| Protein | | | |
| Metallothionein-II | Kaninchen | Enzo Life Sciences, Lörrach | ALX-202-071-C500 |

2.1.2 Medikamente, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Medikamente, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

| Produkt | Hersteller |
|---|---------------------------|
| 0,5 ml Reagenzgefäße | Eppendorf, Hamburg |
| 1,5 ml Reagenzgefäße | Eppendorf, Hamburg |
| 18 G – Kanülen, BD Microlance™ | BD, USA, |
| 2,0 ml Reagenzgefäße | Eppendorf, Hamburg |
| 2,3,5 – Triphenyltetrazoliumchlorid (ITC) | Merck, Darmstadt |
| 30 G – Kanülen, Sterican ® | Braun, Melsungen |
| 3M™ Durapore™ Medical tapes | 3M, USA |
| 5 % Dexpanthenol (Bepanthen ® Augensalbe) | Bayer, Leverkusen |
| 50 ml Reagenzröhrchen, Falcon | BD, USA |
| <i>Accelerator</i> | Bob Smith Industries, USA |

| Produkt | Hersteller |
|---|--|
| Actilyse®, Alteplase (rtPA) | Boehringer Ingelheim Pharma, Ingelheim am Rhein |
| BD Plastikpak™ 1ml-Spritze | BD, USA |
| Buprenorphin (Temgesic ®) | Essex Chemie AG, Schweiz |
| Citratpuffer (selbst hergestellt) | 6 g Zitronensäure, 3 l deionisiertes (d)H ₂ O, pH 6,0 |
| D- Sucrose | Fluka Analytical, Schweiz |
| DAPI BioChemica | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Deckgläser, 24x48mm | Menzel, Braunschweig |
| Essigsäure Emsure ® | Merck, Darmstadt |
| Ethanol 99 % | Chemie-Vertrieb Hannover |
| Ethanol absolute Emplura ® | Merck, Darmstadt |
| FettstiftDako Pen | DAKO, Dänemark |
| Flüssigstickstoff | Linde AG, Pullach |
| Gewebekulturschalen, 10 ml | Sarstedt, Nümbrecht |
| Immu-Mount (20ml) | Thermo Scientific, USA |
| Injekt ®-F 1ml -Spritze ohne Totraumvolumen | Braun, Melsungen |
| Isofluran (Forene ®) | Abbott, Schweiz |
| Kaliumpermanganat | FlukaChemika, Schweiz |
| NaCl, 50 ml in Glasflasche | Fresenius Kabi Deutschland, Homburg |
| Natriumhydroxid | FlukaChemika, Schweiz |
| Objektträger, Superfrost ® Plus | Menzel, Braunschweig |
| Objektträgerkasten | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |
| PBS pH 7,4 | Life technologies™gibco ®, USA |
| PFA pH7 Roti®-Histofix 4 % | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Roti ®-Histokitt II | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Rotilabo®-Einbettkassetten, für Biopsien | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| TBS (selbst hergestellt) | 800 ml dH ₂ O, 8 g NaCl, 2,4 g Tris-Base, pH 7,6 |
| Tissue Tek Filterblock für Einbettkassetten SA-4699 | Vogel GmbH & Co. KG, Giessen |
| Transferringpipetten | Sarstedt, Nümbrecht |
| Triton-X-100 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

| Produkt | Hersteller |
|---|---------------------------|
| Tuberkulinspritzen (25 G), Omnifix ®-F, 1ml | Braun, Melsungen |
| Wattestäbchen | Beese Medical, Barsbüttel |
| Xylol (Isomere) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

2.1.3 Chirurgisches Instrumentarium und Nahtmaterial

Tabelle 3: Chirurgisches Instrumentarium und Nahtmaterial

| Produkt | Hersteller |
|--|--------------------------------------|
| 3-0 PH - Seide, FS-1, Rundnadel 24mm B/8c, 45cm | Ethicon (Johnson-Johnson Intl.), USA |
| 5-0 Mersilene <i>Suture</i> , 6x45cm | Ethicon (Johnson-Johnson Intl.), USA |
| 6-0 fine MCAO <i>Suture</i> L910 PK5Re | Doccol Corporation, USA |
| Chirurgische Schere (<i>surgical scissors</i>) | Fine Science Tools, USA |
| Feine / spitze Pinzette (<i>Dumont #5CO forceps</i>) | Fine Science Tools, USA |
| Feine Schere (<i>extra fine Bonn scissors</i>) | Fine Science Tools, USA |
| Gebogene Dumont Pinzetten #7 (<i>Dumont forceps</i>) | Fine Science Tools, USA |
| Gefederte Schere (<i>Vannas Spring scissors</i>) | Fine Science Tools, USA |
| Gehirnschneider (<i>mouse brain matrix</i>) | ASI instruments, USA |
| Große Schere (<i>surgical scissors – sharp/ blunt</i>) | Fine Science Tools, USA |
| Kleiner Nadelhalter (<i>Olsen-Hegar-needle holder</i>) | Fine Science Tools, USA |
| Mikrovaskularklemme (<i>microvascular clamp</i>) | Fine Science Tools, USA |
| Mittelgroße Schere (<i>standard pattern scissors</i>) | Fine Science Tools, USA |
| Nadelhalter (<i>needle holder</i>) | Fine Science Tools, USA |
| Pinzette (<i>applying forceps for micro clamp</i>) | Fine Science Tools, USA |
| Pinzette (<i>student Adson forceps</i>) | Fine Science Tools, USA |
| Rasierklingen Isana Men | Rossmann, Hannover |
| Spatel (<i>spatula and probe</i>) | Fine Science Tools, USA |

2.1.4 Geräte

Tabelle 4: Geräte

| Produkt | Hersteller |
|--|------------------------------------|
| Anästhesiesystem für Isofluran | Dräger, Lübeck |
| <i>Axio Cam MRm</i> (Kamera Mikroskop) | Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena |
| <i>Axio Examiner. Z1</i> (Mikroskop) | Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena |
| Cryoschneidemaschine CM 3050S | Leica, Wetzlar |
| Floureszenzlampe HXP 120C | Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena |
| <i>Homeothermic Blanket Control Unit</i> | Harvard Apparatus, USA |
| Kühle Lichtquelle KL 1500 LCD | Schott, Jena |
| Kühlzentrifuge 5415R | Eppendorf, Hamburg |
| Mikroskop Stemi 2000 | Zeiss, Jena |
| Mikrowelle | Sharp, Japan |
| Narkosebox | Grappler Medizintechnik, Degendorf |
| Perfusionspumpe Reglo Digital MS-2/12 ISM 596D | Ismatec SA, Schweiz |
| Schüttler | Biometra, Göttingen |
| SMC 2009 | Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena |
| Tischzentrifuge Sprout | Kisker, Steinfurt |
| Trockenschrank Heraeus | Kendro Laboratory Products, Hanau |
| Vortex-Gerät VF2 | Janke & Kunkel, Staufen |
| Waage BL 210 S | Sartorius, Göttingen |
| Waage BL 3100 | Sartorius, Göttingen |

2.1.5 Software

Tabelle 5: Software

| Software | Hersteller |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| Adobe Photoshop | Adobe Incorporated, USA |
| AxioVision 40V 4.8.2.0 | Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena |
| Fiji (ImageJ2, Version 2.3.0/1.53f) | National Institutes of Health, USA |

| Software | Hersteller |
|--|-------------------------------------|
| Graph Pad Prism 5 & 9 | GraphPad Software Incorporated, USA |
| MS Office Word/Excel für Mac | Microsoft Corporation, USA |
| Zen Version 1.0.0.0 (Software Mikroskop) | Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena |

2.1.6 Versuchstiere

Tabelle 6: Versuchstiere

| Spezies | Züchter |
|----------------|--------------------------------------|
| C57 BL/6N Maus | Charles River Laboratories, Sulzfeld |

2.2 Methoden

2.2.1 Tierhaltung, allgemeine Versuchsanordnung, Randomisierung

Es wurden männliche C57bl/6N Mäuse (*Charles River Laboratories*, Sulzfeld, Germany) als Versuchstiere gewählt. Das Durchschnittsgewicht lag bei 25,4 g. Die Tiere wurden in einem 12h Hell/Dunkel- Rhythmus 2 Wochen in der Zentralen-Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen akklimatisiert und in einem Alter von 11 Wochen operiert. Während der gesamten Zeit standen Wasser und Futter zur freien Verfügung. Die Versuche wurden unter strenger Einhaltung des Tierschutzgesetzes und in Übereinstimmung der Richtlinien des Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit durchgeführt (TVA Nr. 12/0849).

Folgende Kriterien wurden vor Beginn des Experiments als Ausschlusskriterien definiert:

- Eine Gewichtsreduktion von größer als 25 % während des Experiments
- Tod des Versuchstiers innerhalb der ersten sechs Stunden *postoperativ*
- Kein histologischer Infarktnachweis in der durchgeführten TTC-Färbung

Tabelle 7: Mortalität und Komplikationen

| Gruppe | Tierzahl n. Ausschluss | verstorben | Exklusion bei <i>intra/postop.</i> Komplikationen |
|------------|------------------------|------------|---|
| NaCl | 13 | 5 | 2 |
| MT-II | 12 | 0 | 3 |
| rtPA | 13 | 2 | 2 |
| rtPA/MT-II | 11 | 0 | 4 |

Intra- bzw. *postoperative* Komplikationen konnten bei 11 Tieren beobachtet werden, hierbei handelte es sich fast ausschließlich um *intraoperative* bzw. direkt *postoperativ* aufgetretene Blutungskomplikationen, außerdem wurde ein Versuchstier, bei fehlendem Infarktnachweis in der TTC-Färbung, ausgeschlossen.

Die Mortalitätsrate während des Experiments lag bei 14,28 % (n=7). Die Versuchstiere bzw. die Therapien wurden durch eine unabhängige Person randomisiert, so dass der Untersucher über die gesamte Dauer des Experiments und während jeder Auswertung verblindet war.

2.2.2 Modell der transienten fokalen zerebralen Ischämie

In der experimentellen Schlaganfallforschung ist das Fadenmodell zur Auslösung einer transienten fokalen Ischämie seit mehreren Jahren das Mittel der Wahl. Wir wählten in dieser Arbeit das modifizierte Protokoll nach Engel et al. (2011).

Die Narkose wurde mit 4 % Isofluran und 100 % O₂ unter einem *Flow* von 0,8 l/min eingeleitet. Die Analgesie erfolgte mittels *intraperitoneal* injiziertem Buprenorphin (0,1 mg/kg KG) (Temgesic, Essex Pharma, München, Deutschland). Zum Erhalt der Narkose wurde auf die Inhalationsanästhesie auf 1 % Isofluran reduziert, sodass eine Spontanatmung des Versuchstiers während der Operation gewährleistet war.

Nach Reflexkontrolle zur Vergewisserung, dass das Tier ausreichend anästhesiert war, erfolgte die Fixierung mittels Pflaster (Hansaplast Sensitive) auf der vorgeheizten Wärmeplatte. Nach der Desinfektion des Operationsgebietes mit Ethanol 99 % erfolgte *paramedian* rechts ein ca. 0,7 cm langer Hautschnitt im Bereich der *regio trachealis*. Per stumpfe Präparation wurde die rechte *Arteria carotis communis* und ihre Bifurkation mit *Arteria carotis externa* und *interna* dargestellt. Die Ischämie wurde unter Verwendung eines silikonummantelten 6-0 Fadens (*6-0 fine MCAO Suture, Doccol Corporation, USA*) eingeleitet. Hierfür wurden die rechte *Arteria carotis communis proximal* und die *Arteria carotis externa* kurz nach der Bifurkation (siehe Abbildung 2B) ligiert (*5-0 Mersilene Suture, Ethicon, Johnson-Johnson Intl, USA*). Der temporäre Verschluss der *Arteria carotis interna* erfolgte mittels einer Mikrovaskularklemme. Nach vorsichtiger Inzision der rechten *Arteria carotis communis* wurde der silikonummantelte Faden in das Gefäß eingeführt und langsam über die *Arteria carotis interna* weiter in die *Arteria cerebri media* vorgeschoben, was einen gezielten Verschluss ermöglichte. Die Reperfusion des Gewebes wurde nach 45 min durch das Zurückziehen und Entfernen des Fadens eingeleitet. Nach der intravenösen Injektion (siehe 2.2.3) wurde die Haut mittels Naht verschlossen und die Anästhesie beendet. Die Fähigkeit eine suffiziente Okklusion durchzuführen, zeigte der Autor in einem Vorversuch, bei welchem mittels Laserdopplermessung (PF5010, Perimed, Schweden) die suffiziente Flussunterbrechung im Bereich der rechten *Arteria cerebri media* nachgewiesen wurde. Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde während der Operation mit einer Wärmeplatte bei 36-37 °C konstant gehalten. Nach 24 Stunden folgte eine erneute i.p. Analgesie mit Buprenorphin (0,1 mg/kg KG) (Temgesic, Essex Pharma, München, Deutschland).

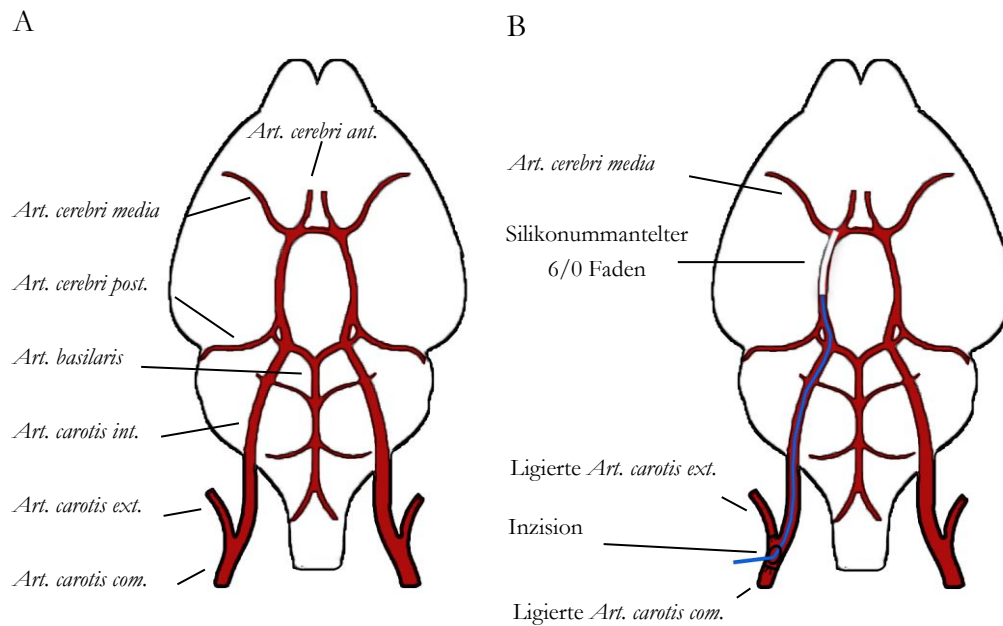


Abbildung 2: Schematische Darstellung: A: Gefäßversorgung, B: MCAO

2.2.3 Intravenöse Applikation und Dosierungen

Exakt 5 min nach der Reperfusion erfolgte die intravenöse Injektion in die rechte *Vena facialis anterior*. Die Vene wurde unter Sicht und mithilfe von einer kleinkalibrigen Injektionskanüle (STERICAN Kanüle 30G 0,30x12 mm, B. Braun, Melsungen AG) punktiert (mod. Levene et al. 2007) und nach Aspiration erfolgte die Injektion. Die Dosierung von 5 μg /10 g Körpergewicht der Maus des MT-II (*rabbit Zn-metallothionein-II* [Enzo Life Sciences, Lörrach, Germany]) wählten wir auf Grundlage der Ergebnisse der Zellkulturversuche von Fr. Dr. Dorette Freyer (Berlin), die diese Versuche für unsere Arbeitsgruppe durchgeführt hatte (Eidizadeh et al. 2015). Die Dosierung des rtPA wurde analog zum klinischen Alltag (Actilyse, Boehringer Ingelheim) mit 0,9 mg/kg KG gewählt (Haelewyn et al. 2010; Sena et al. 2010). Die Kontrollgruppe wurde mit 0,9 % NaCl behandelt.

2.2.4 Neurologische Scores

Die Evaluation mittels neurologischer Tests erfolgte nach 0 h, 24 h und 48 h in Bezug auf die Reperfusion und durch den verblindeten Behandler. Als neurologische Tests wurden der Bederson-Score (Bederson et al. 1986) und der *modified Neurological Severity Score* (mNSS) (Garcia et al. 1995; Li et al. 2000) gewählt.

2.2.4.1 Bederson-Score

Der Bederson-Score (Bederson et al. 1986) wurde 1986 zur Bewertung des neurologischen Defizits nach MCAO entwickelt. Es folgten Modifizierungen durch Hara et al. (1996) und Harhausen et al. (2010), welche eine Punkteverteilung von 0-4 definierten.

Tabelle 8: Bederson-Score

| | |
|---------|--|
| Score 0 | Kein Defizit |
| Score 1 | Fehlendes Streckvermögen der Vorderpfote |
| Score 2 | Drehen zur kontralateralen Seite |
| Score 3 | Verlust des Haltungsreflexes |
| Score 4 | Tod |

2.2.4.2 *Modified Neurological Severity Score* (mNSS)

Der mNSS gibt im Vergleich zum Bederson-Score eine deutlich dezidiertere Auskunft über die Sensomotorik. Er umfasst insgesamt fünf Untersuchungen, wobei drei Untersuchungen die motorischen Einschränkungen und zwei Untersuchungen die sensorischen Defizite erfassen. In jeder Kategorie können zwischen einem und drei Punkte erreicht werden, sodass ein Minimum von fünf Punkten und ein Maximum von 15 Punkten zu erreichen sind. Die Punkteverteilung ist in Tabelle 9 aufgeschlüsselt. Verstorbene Tiere werden in diesem Test exkludiert (Garcia et al. 1995; Li et al. 2000).

Tabelle 9: *Modified Neurological Severity Score*

| Motorik | |
|---|--|
| Spontane Aktivität (Die Maus wird in einen frischen Käfig gesetzt und bis zu 5 min beobachtet) | Score 3: Normale Aktivität (bewegt sich und nähert sich mind. drei Käfigwänden an) |
| | Score 2: Leichte Beeinträchtigung (bewegt sich und nähert sich mind. einer Käfigwand an) |
| | Score 1: Starke Beeinträchtigung (wenig bis keine Bewegung) |
| Klettern (Die Maus wird auf ein Drahtgitter gesetzt und bis zu 3 min beobachtet) | Score 3: Uneingeschränkte Kletterfähigkeit mit normaler Kraft |
| | Score 2: Leichte Beeinträchtigung (einseitig eingeschränkt, Kraft abgeschwächt) |
| | Score 1: Starke Beeinträchtigung (klettert im Kreis oder fällt) |
| Gleichgewicht und Koordination (Die Maus wird auf eine im Durchmesser 1,5 cm große Stange 45 cm über dem Boden gesetzt und für 1,5 min beobachtet) | Score 3: Keine Einschränkung (hält sich und läuft zum Ende der Stange) |
| | Score 2: Leichte Beeinträchtigung (hält sich, bewegt sich allerdings nicht von der Stelle) |
| | Score 1: Starke Beeinträchtigung (fällt im Verlauf oder sofort) |
| Sensorik | |
| Ohrmuschel-Reflex (Die Ohrmuschel der Maus wird mittels Wattestäbchen berührt und die Reaktion wird beobachtet) | Score 3: Keine Einschränkung (zeigt adäquate Reaktion <i>ipsi-</i> und <i>kontralateral</i>) |
| | Score 2: Leichte Beeinträchtigung (zeigt <i>ipsilateral</i> abgeschwächte Reaktion) |
| | Score 1: Starke Beeinträchtigung (zeigt <i>ipsilateral</i> keine Reaktion) |
| Propriozeption (Die Maus wird mittels Wattestäbchen seitlich auf Höhe des Halses berührt und die Reaktion wird beobachtet) | Score 3: Keine Einschränkung (zeigt adäquate Reaktion <i>ipsi-</i> und <i>kontralateral</i>) |
| | Score 2: Leichte Beeinträchtigung (zeigt <i>ipsilateral</i> abgeschwächte Reaktion) |
| | Score 1: Starke Beeinträchtigung (zeigt <i>ipsilateral</i> keine Reaktion) |

2.2.5 Perfusion, Präparation der Gewebe

Nach Abschluss des Überwachungszeitraums von 48 h nach Reperfusion wurden die Tiere bei Isofluran 5 % mit einem O_2 -Flow von 0,8 l/min in eine letale Narkosetiefe versetzt. Anschließend, nach Aussetzen aller Reflexe, wurde der Thorax eröffnet und der linke Ventrikel im Bereich der Herzspitze punktiert. Nun folgte das Einbringen der Perfusionskanüle und die Perfusion für 5 min mit der Perfusionspumpe (Ismatec SA, Schweiz) bei einer Flussrate 10 ml/min mit *Phosphate-buffered saline* (PBS).

Nach Entnahme wurde das Gehirn mittels Hirnmatrix *koronar* in 2 mm Scheiben geschnitten, sodass die Infarktmetrie durch die Färbung mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) erfolgen konnte.

2.2.6 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung und Infarktmetrie

Die 2 mm dicken Schnitte werden zunächst in einer Lösung (2 %) aus 1 g TTC (Merck, Darmstadt) sowie 50 ml PBS für insgesamt 10 min (5 min pro Seite) inkubiert. Anschließend folgt die Fixierung mittels Paraformaldehyd (PFA) für 10 min (Türeyen et al. 2004). Die gereinigten Schnitte werden anschließend mittels Scanner und angelegtem Zentimetermaß digitalisiert, sodass eine digitale Auswertung mit *Fiji (ImageJ2, Version 2.3.0/1.53f)* erfolgen kann.

Das direkte Infarktvolumen, in Abbildung 3 als Region A dargestellt, wird in den verschiedenen Schnitten gemessen und anschließend addiert und mit der Dicke der Schnitte (2 mm) multipliziert. Das indirekte Infarktvolumen ist die Differenz von den in Abbildung 3 dargestellten Regionen C und B, also die *kontralaterale* Hemisphäre und die *ipsilaterale* nicht infarzierte Fläche. Die Ergebnisse der Subtraktion wurden dann ebenfalls addiert und mit zwei multipliziert. Die ödematöse Schwellung ergibt sich aus der Differenz der direkten und indirekten Infarktmetrie (Swanson et al. 1990).

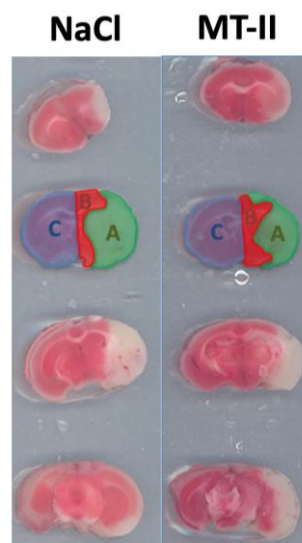


Abbildung 3: TTC-Färbung und Infarktmetrie (Ansicht von *kaudal* nach *rostral*)
A: Direktes Infarktvolumen B: Nicht-infarzierter Anteil *ipsilaterale* Hemisphäre C: *Kontralaterale* Hemisphäre

2.2.7 Präparation Schnitte für Immunhistochemie und Immunhistochemie

Nach Digitalisierung der 2 mm Schnitte wurden die Schnitte für weitere 24 h in PFA 4 % bei 4 °C inkubiert und anschließend folgte die Dehydratation für 24 h in Sucroselösung 30%. Nun wurden die Schnitte in *Cryomatrix* (*ShandonCryomatrix*, *Thermo Scientific*) eingebettet und bei -80 °C gelagert, bis sie am *Cryostat* in 12 µm dicke Schnitte weiterverarbeitet und anschließend auf Objektträger aufgebracht wurden.

Der Blockpuffer bestand aus Eselserum 5 %, Triton-X-100 0,25 % und *Tris-buffered saline* (TBS). Zunächst wurden die 12 µm *Cryoschnitte* auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend 10 min in 2 Wachsritten auf dem Schüttler in TBS gereinigt. Währenddessen wurde der Citratpuffer bei 800 W in der Mikrowelle bis an den Siedepunkt erhitzt. Anschließend wurden die Objektträger im Citratpuffer 4 min bei 80 W in der Mikrowelle erwärmt. Es folgte das Abkühlen für 30 min und erneutes Waschen (2x5 min) der Objektträger. Zur Inkubation wurden die Objektträger nun mit 250 µl Blockpuffer beträufelt. Nach 24 h Inkubationszeit bei 4 °C wurde der Primärantikörper aufgetragen. Die Mischverhältnisse in Bezug auf den Blockpuffer waren:

NeuN-Iba1-Doppelfärbung:

- *Neuron-specific nuclear antigen* (NeuN) (Spezies: Maus) 1:500
- *Ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba1) (Spezies: Kaninchen) 1:1000

Nach 24 h Inkubationszeit und erneutem Waschen mit TBS erfolgte das Auftragen der Sekundärantikörper. Die Mischverhältnisse in Bezug auf den Blockpuffer waren:

Doppelfärbung:

- *anti-mouse* Cyanin (Cy)5 (Spezies: Esel) 1:250
- *anti-rabbit* Cy3 (Spezies: Esel) 1:250

Nach der Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur, erfolgten erneut vier Waschschrte in TBS für 5 min. Anschließend erfolgte die Inkubation für 10 min auf dem Schüttler in 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) bei einer Konzentration von 2 µg/ml. Zum Abschluss folgt der letzte Waschschrte für 5 min in TBS und das Eindecken mit *ShandonCryomatrix*.

2.2.8 Digitalisierung der histologischen Präparate

Die Präparate wurden mit dem Mikroskop *Axio Examiner Z1* mikroskopiert und anschließend mit der *Axio Cam MRm* aufgenommen und mittels Zen-Software (Zen Version 1.0.0.0, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) digitalisiert.

2.2.9 Zellzahlbestimmung

2.2.9.1 Bestimmung von NeuN - positiven Zellen

Die Zellzahlbestimmung erfolgte anhand der immunhistochemisch gefärbten Schnitte in der *interaurenalen* Ebene 2,34 mm. Die NeuN positiven Neurone wurden durch drei zuvor bestimmte Kästen mit einer definierten Höhe von 200 μm und über die gesamte horizontale Breite der Schnitte gezählt.

Die Kästen wurden (wie in Abbildung 4 dargestellt) angeordnet:

- Kasten A: *Kranial* des Hippocampus, im Bereich des *Corpus callosum*
- Kasten B: *Kaudal* des dorsalen Anteils des 3. Ventrikels, im Bereich des *Thalamus*
- Kasten C: *Kranial* des ventralen Anteils des 3. Ventrikels, im Bereich des *Hypothalamus*

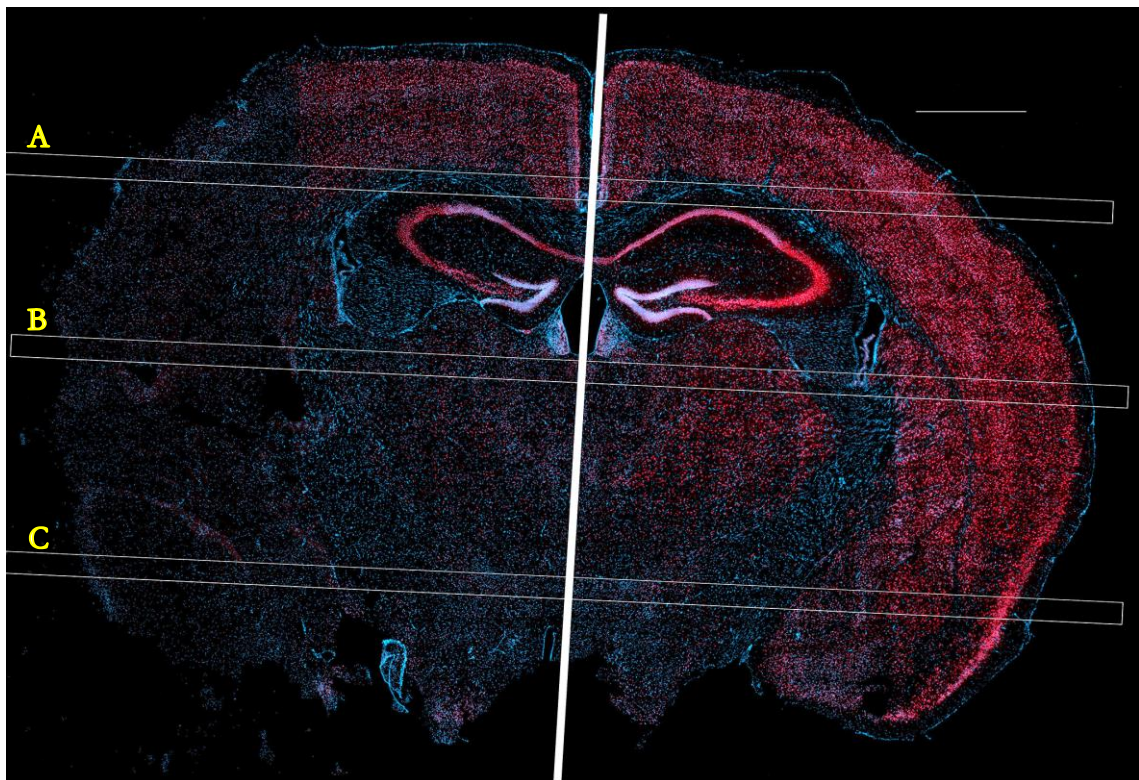


Abbildung 4: Schnitt (*interaurale* Ebene 2,34 mm) in NeuN/DAPI-Färbung mit Kästen (A-C)

Anschließend wurden die Gesamtflächen der Kästen mittels *Fiji (ImageJ2, Version 2.3.0/1.53f)* ausgemessen und die Zellzahlen in Anzahl pro Quadratmillimeter angegeben.

2.2.9.2 Bestimmung von Iba1 - positiven Zellen

Die aktivierte Mikroglia wurde über die gesamte Hemisphäre ausgezählt und anschließend die Größen der Hemisphären mittels *Fiji* ausgemessen. Die aktivierte Mikroglia wurde dann pro Quadratmillimeter angegeben. Wie in Abbildung 5 lässt sich die aktivierte Form der Mikroglia (A), aufgrund ihres kondensierten Zustandes, gut von der inaktiven Form (B) unterscheiden.

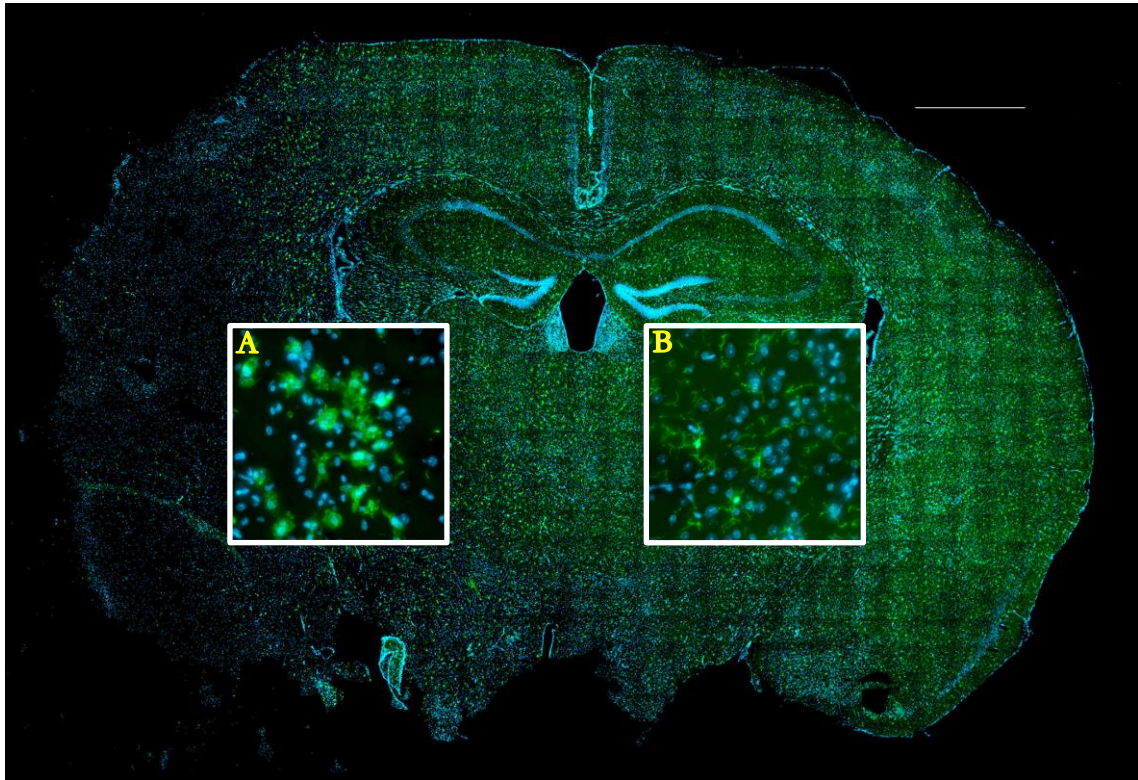


Abbildung 5: Schnitt (*interaurale* Ebene 2,34 mm) Iba1- Färbung sowie vergrößerte Darstellung: A: aktivierte Mikroglia, B: inaktive Mikroglia

2.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit *GraphPad Prism*. Zum Vergleich des Gewichts, der Temperatur, des direkten Infarktolumens, des indirekten Infarktolumens, der ödematösen Schwellung, der Zellzahlen und der Neuroscores wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Bonferroni-Test als *Post-hoc-Test* angewandt. Das Überleben wurde mittels *Log-Rank-Test* (Mantel-Cox-Test) berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Physiologische Parameter

Es erfolgten regelmäßige Messungen der Körpertemperatur sowie des Körpergewichts. Der Gewichtsverlust von größer als 25 % wurde als Ausschlusskriterium definiert.

3.1.1 Körpergewicht

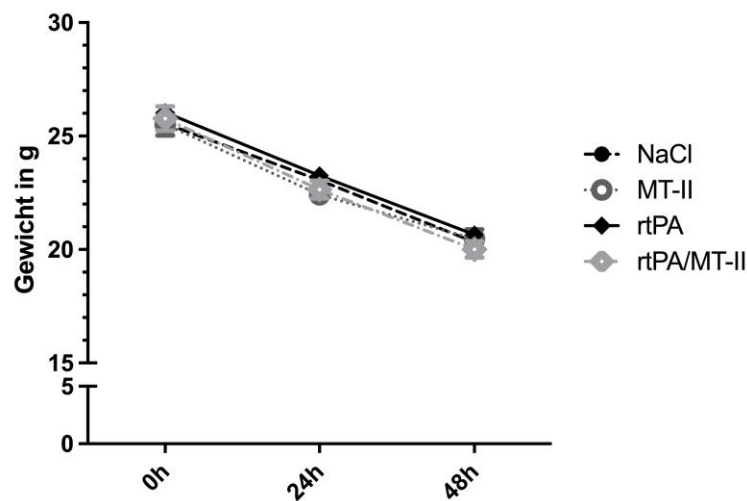


Abbildung 6: Verlaufskurve des Körpergewichts

Zu Beginn des Experiments betrug das durchschnittliche Körpergewicht in der MT-II Gruppe $25,53 \text{ g} \pm 0,49 \text{ g}$ (SEM) ($n = 12$), dass der Kontrollgruppe (NaCl) $25,55 \text{ g} \pm 0,32 \text{ g}$ ($n = 13$), dass der rtPA Gruppe $26,05 \text{ g} \pm 0,34 \text{ g}$ ($n = 13$) und dass der rtPA/MT-II Gruppe $25,77 \text{ g} \pm 0,53 \text{ g}$ ($n = 11$).

Im Verlauf des Experiments zeigte sich ein deutlicher Gewichtsverlust, sodass nach dem Beobachtungszeitraum von 48 h das Durchschnittsgewicht in der MT-II Gruppe bei $20,47 \text{ g} \pm 0,43 \text{ g}$ (SEM) ($n = 12$), dass der Kontrollgruppe (NaCl) bei $20,33 \text{ g} \pm 0,29 \text{ g}$ ($n = 8$), dass der rtPA Gruppe bei $20,66 \text{ g} \pm 0,22 \text{ g}$ ($n = 11$) und dass der rtPA/MT-II Gruppe bei $20,01 \text{ g} \pm 0,36 \text{ g}$ ($n = 11$) lag.

Es zeigten sich keine gruppenspezifischen signifikanten Unterschiede.

(Abbildung und Daten veröffentlicht in Eidizadeh et al. 2015)

3.1.2 Körpertemperatur

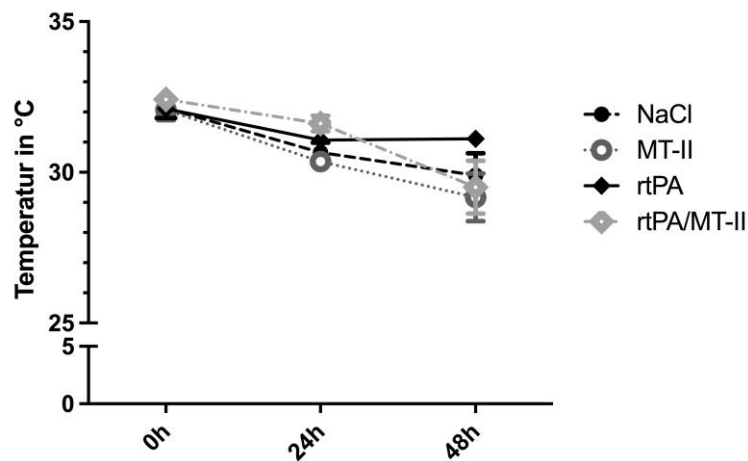


Abbildung 7: Verlaufskurve der Körpertemperatur

Die durchschnittliche oberflächliche Körpertemperatur in der MT-II Gruppe betrug $32,07\text{ °C} \pm 0,33\text{ °C}$ (SEM) ($n = 12$), dass der Kontrollgruppe (NaCl) $32,12\text{ °C} \pm 0,26\text{ °C}$ ($n = 13$), dass der rtPA Gruppe $32,11\text{ °C} \pm 0,31\text{ °C}$ ($n = 13$) und dass der rtPA/MT-II Gruppe $32,41\text{ °C} \pm 0,16\text{ °C}$ ($n = 11$).

Im Beobachtungszeitraum zeigte sich ein Abfall der Körpertemperatur.

Nach 48h betrug die durchschnittliche oberflächliche Körpertemperatur in der MT-II Gruppe $29,17\text{ °C} \pm 0,79\text{ °C}$ (SEM) ($n = 12$), dass der Kontrollgruppe (NaCl) $29,90\text{ °C} \pm 0,73\text{ °C}$ ($n = 8$), dass der rtPA Gruppe $31,11\text{ °C} \pm 0,23\text{ °C}$ ($n = 11$) und dass der rtPA/MT-II Gruppe $29,51\text{ °C} \pm 0,88\text{ °C}$ ($n = 11$).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

(Abbildung und Daten veröffentlicht in Eidizadeh et al. 2015)

3.2 Neuro-Scoring

3.2.1 Bederson Score

Tabelle 10: Ergebnis Bederson-Score

| Zeit | 24 h | | | | 48 h | | | |
|--------------------|------|-------|------|------------|------|-------|------|------------|
| | NaCl | MT-II | rtPA | rtPA/MT-II | NaCl | MT-II | rtPA | rtPA/MT-II |
| Median | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 1,00 | 1,00 |
| 25 %- Perzentil | 1,00 | 1,25 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,25 | 1,00 | 1,00 |
| 75 %- Perzentil | 3,50 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 4,00 | 2,75 | 2,00 | 2,00 |
| Anzahl n | 13 | 12 | 13 | 11 | 13 | 12 | 13 | 11 |

A: 24 h

B: 48 h

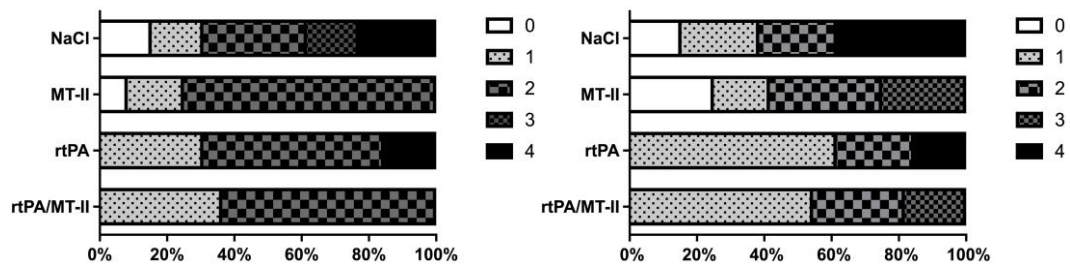


Abbildung 8: Ergebnis Bederson-Score A: 24 h /B: 48 h

Im hier dargestellten Neuroscore nach Bederson (Abbildung 8) konnten weder nach 24 h (A) noch nach 48 h (B) und in keiner Vergleichsvariante signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt werden. Der Bederson-Score schließt verstorbene Tiere mit ein, somit sind in der Tabelle 10 die Tierzahlen über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant.

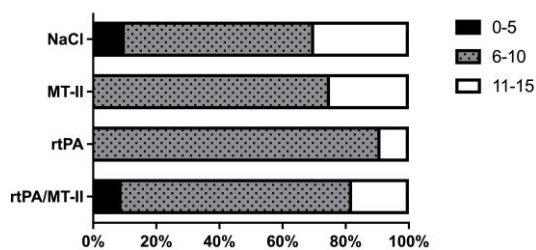
(Abbildung 8B und Daten veröffentlicht in Eidizadeh et al. 2015)

3.2.2 Modified Neurological Severity Score (mNSS)

Tabelle 11: Ergebnis mNSS Score

| Zeit | 24 h | | | | 48 h | | | |
|--------------------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|------------|
| Gruppe | NaCl | MT-II | rtPA | rtPA/MT-II | NaCl | MT-II | rtPA | rtPA/MT-II |
| Median | 8,00 | 9,00 | 8,00 | 10,00 | 9,50 | 9,00 | 9,00 | 9,00 |
| 25 %- Perzentil | 6,00 | 8,25 | 7,00 | 7,00 | 7,25 | 6,25 | 8,00 | 5,00 |
| 75 %- Perzentil | 11,25 | 10,75 | 10,00 | 10,00 | 12,00 | 11,00 | 11,00 | 12,00 |
| Anzahl n | 10 | 12 | 11 | 11 | 8 | 12 | 11 | 11 |

A: 24 h



B: 48 h

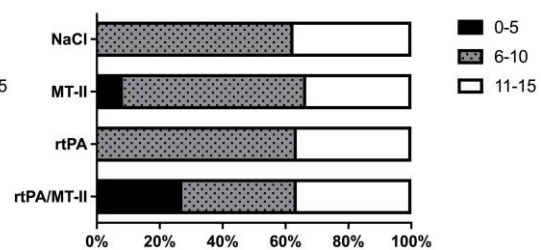


Abbildung 9: Ergebnis mNSS Score A: 24 h /B: 48 h

Im hier dargestellten mNSS-Score (Abbildung 9) konnten weder nach 24 h (A) noch nach 48 h (B) und in keiner Vergleichsvariante signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt werden. Der mNSS-Score schließt verstorbene Tiere aus.

3.3 Infarktmetrie

3.3.1 Direktes Infarktvolumen

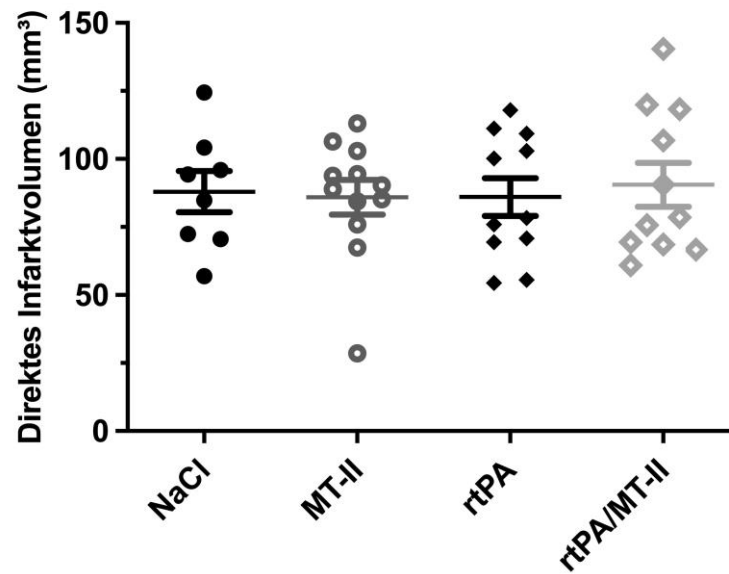


Abbildung 10: Direktes Infarktvolumen

Das durchschnittliche direkte Infarktvolumen der MT-II Gruppe betrug $85,96 \text{ mm}^3 \pm 6,36 \text{ mm}^3$ (SEM) ($n = 12$), dass der Kontrollgruppe (NaCl) $87,97 \text{ mm}^3 \pm 7,57 \text{ mm}^3$ ($n = 8$), dass der rtPA Gruppe $86,02 \text{ mm}^3 \pm 6,92 \text{ mm}^3$ ($n = 11$) und dass der rtPA/MT-II Gruppe $90,55 \text{ mm}^3 \pm 8,06 \text{ mm}^3$ ($n = 11$).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

(Daten veröffentlicht in Eidizadeh et al. 2015)

3.3.2 Indirektes Infarktvolumen

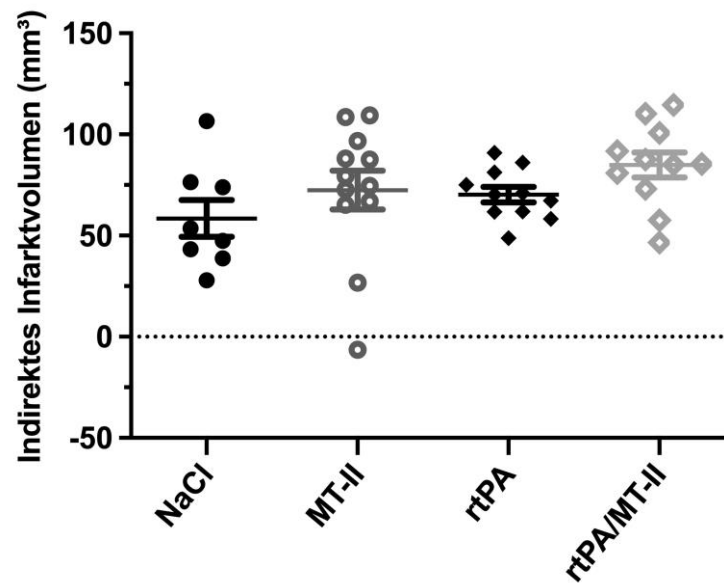


Abbildung 11: Indirektes Infarktvolumen

Das durchschnittliche indirekte Infarktvolumen der MT-II Gruppe betrug $72,46 \text{ mm}^3 \pm 9,60 \text{ mm}^3$ (SEM) ($n = 12$), dass der Kontrollgruppe (NaCl) $58,48 \text{ mm}^3 \pm 9,03 \text{ mm}^3$ ($n = 8$), dass der rtPA Gruppe $70,22 \text{ mm}^3 \pm 3,79 \text{ mm}^3$ ($n = 11$) und dass der rtPA/MT-II Gruppe $84,86 \text{ mm}^3 \pm 6,17 \text{ mm}^3$ ($n = 11$).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

(Daten veröffentlicht in Eidizadeh et al. 2015)

3.3.3 Ödematöse Schwellung

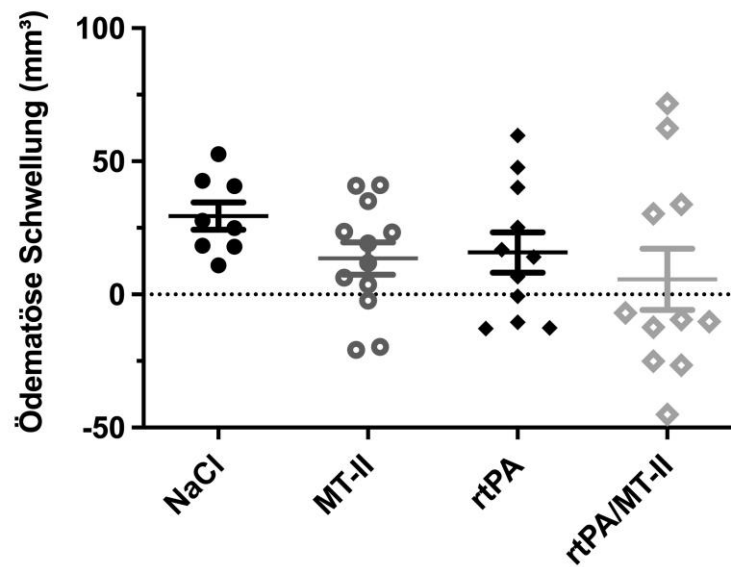


Abbildung 12: Ödematöse Schwellung

Die durchschnittliche ödematöse Schwellung der MT-II Gruppe betrug $13,50 \text{ mm}^3 \pm 6,08 \text{ mm}^3$ (SEM) ($n = 12$), dass der Kontrollgruppe (NaCl) $29,48 \text{ mm}^3 \pm 5,12 \text{ mm}^3$ ($n = 8$), dass der rtPA Gruppe $15,80 \text{ mm}^3 \pm 7,57 \text{ mm}^3$ ($n = 11$) und dass der rtPA/MT-II Gruppe $5,69 \text{ mm}^3 \pm 11,48 \text{ mm}^3$ ($n = 11$).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

(Daten veröffentlicht in Eidizadeh et al. 2015)

3.4 Immunhistochemie

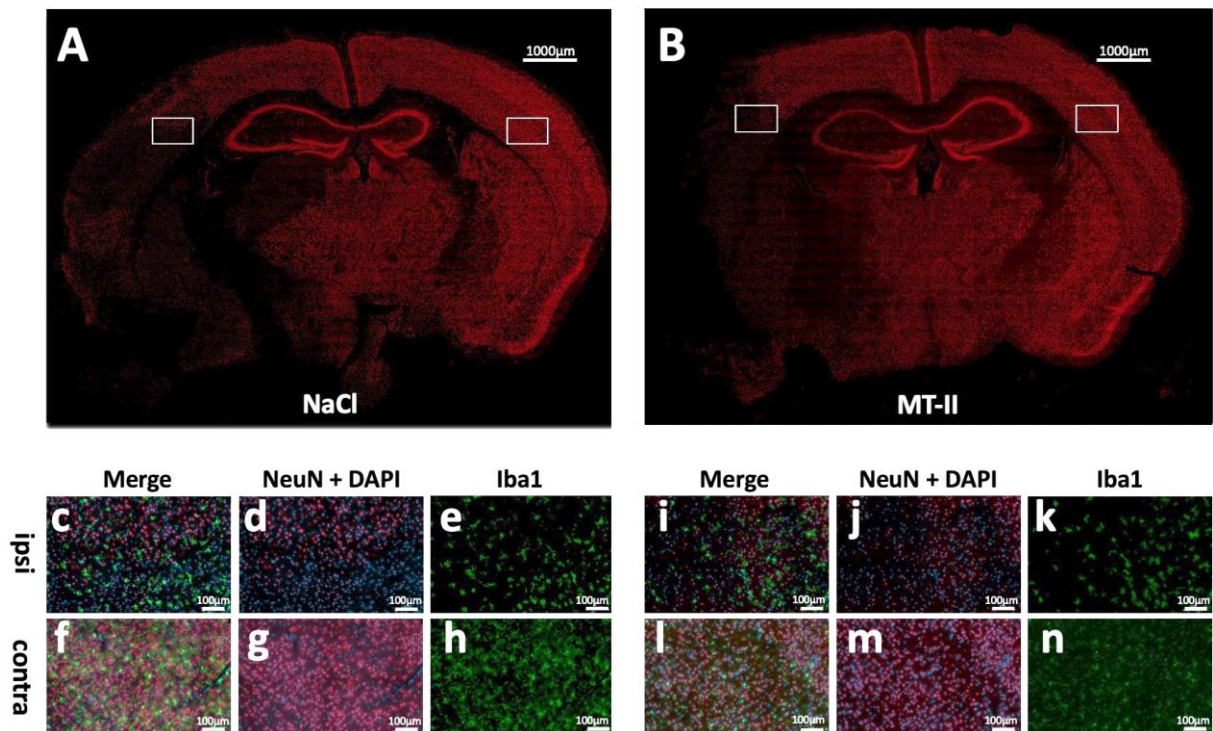


Abbildung 13: Immunhistochemische Darstellung

Die Quantifizierung der Neurone und Mikroglia erfolgten durch NeuN und Iba1 immunhistochemische Färbungen in Gefrierschnitten der *interauralen* Ebene 2,34 mm und sind exemplarisch in Abbildung 13 (A-N) dargestellt.

(Abbildung veröffentlicht in Eidizadeh et al. 2015)

3.4.1 NeuN - positive Zellen

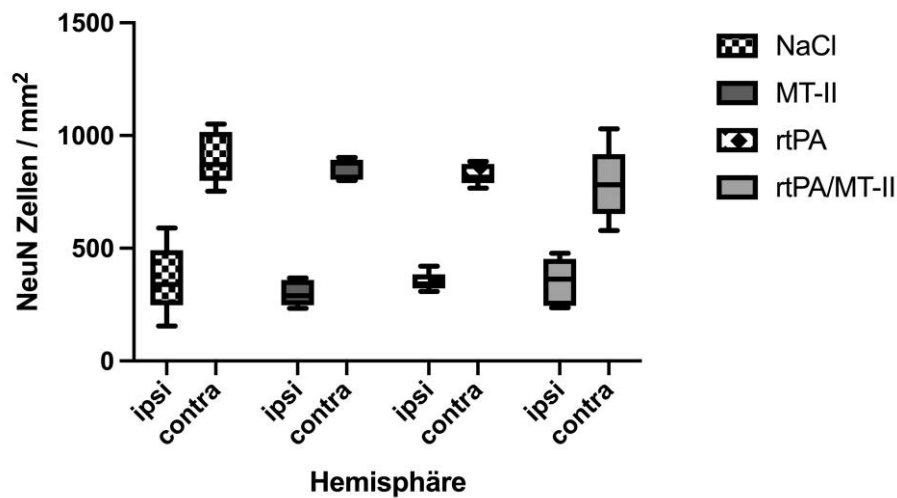


Abbildung 14: NeuN - positive Zellen

Die durchschnittliche Anzahl von Neuronen der MT-II Gruppe lag *ipsilateral* bei 300,39 Zellen/mm² ± 25,71 Zellen/mm² (SEM) und *kontralateral* bei 854,54 Zellen/mm² ± 20,84 Zellen/mm² (SEM) (n = 12).

Die der Kontrollgruppe (NaCl) lag *ipsilateral* bei 363,46 Zellen/mm² ± 69,55 Zellen/mm² (SEM) und *kontralateral* bei 900,15 Zellen/mm² ± 52,20 Zellen/mm² (SEM) (n = 8).

Die der rtPA Gruppe lag *ipsilateral* bei 350,42 Zellen/mm² ± 18,65 Zellen/mm² und *kontralateral* bei 828,44 Zellen/mm² ± 20,830 Zellen/mm² (n = 11).

Die der rtPA/MT-II Gruppe lag *ipsilateral* bei 351,78 Zellen/mm² ± 47,23 Zellen/mm² und *kontralateral* bei 784,09 Zellen/mm² ± 72,99 Zellen/mm² (n = 11).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

3.4.2 Iba1 - positive Zellen

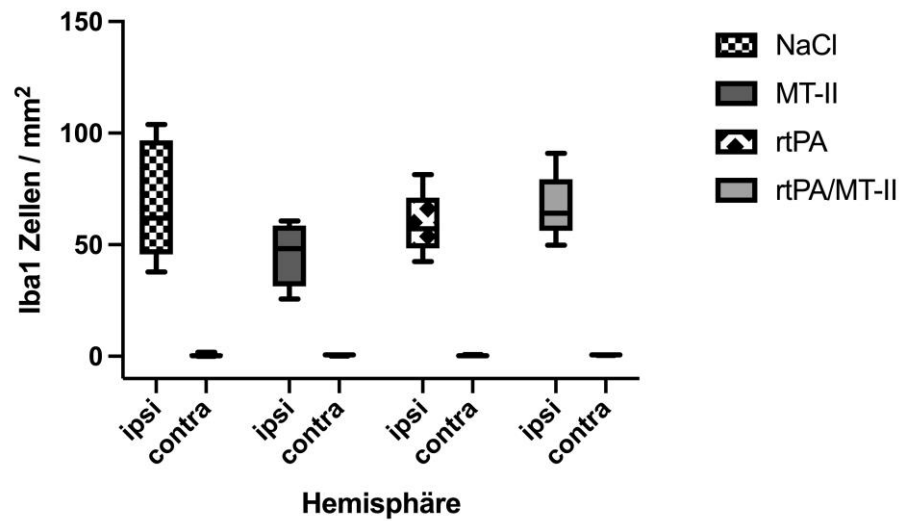


Abbildung 15: Iba1 - positive Zellen

Die durchschnittliche Anzahl von aktivierter Mikroglia der MT-II Gruppe lag *ipsilateral* bei 45,65 Zellen/mm² ± 6,40 Zellen/mm² (SEM) und *kontralateral* bei 0,55 Zellen/mm² ± 0,15 Zellen/mm² (SEM) (n = 12).

Die der Kontrollgruppe (NaCl) lag *ipsilateral* bei 69,41 Zellen/mm² ± 12,05 Zellen/mm² (SEM) und *kontralateral* bei 0,56 Zellen/mm² ± 0,31 Zellen/mm² (SEM) (n = 8).

Die der rtPA Gruppe lag *ipsilateral* bei 59,24 Zellen/mm² ± 6,33 Zellen/mm² und *kontralateral* bei 0,32 Zellen/mm² ± 0,12 Zellen/mm² (n = 11).

Die der rtPA/MT-II Gruppe lag *ipsilateral* bei 67,06 Zellen/mm² ± 6,70 Zellen/mm² und *kontralateral* bei 0,72 Zellen/mm² ± 0,12 Zellen/mm² (n = 11).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

3.5 Mortalität

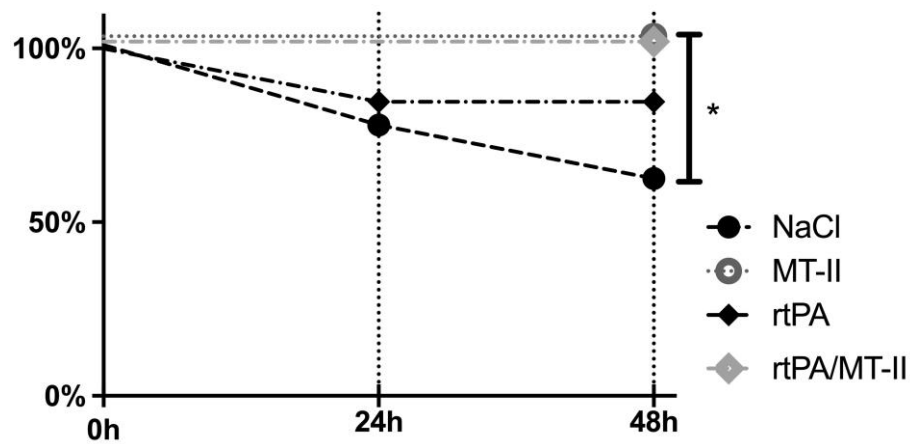


Abbildung 16: Überlebenskurve

Im Überleben nach 48 Stunden zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (NaCl) und der MT-II Gruppe bzw. der MT-II/rtPA Gruppe (* $p = 0,019$), so dass alle Versuchstiere, welche mit MT-II therapiert wurden, signifikant überlebt haben.

(Abbildung und Daten veröffentlicht in (Eidizadeh et al. 2015))

4 Diskussion

4.1 Methodik

Die Thrombolyse mittels rtPA ist bis heute die wichtigste Therapiemöglichkeit des akuten ischämischen Schlaganfalls. Allerdings ist der Einsatz durch das Zeitfenster von 4,5 h und die patientenbezogenen Kontraindikationen limitiert (Ringleb et al. 2022). Seit 2008 wurde die Thrombektomie als zusätzliche Therapiemöglichkeit etabliert, jedoch kommt diese nur bei 5-10 % der Schlaganfallpatienten in Frage (Müller 2017).

Die neuroprotektive Therapie zur Verringerung bzw. Eingrenzung des ischämischen Schadens ist ein vielversprechender Behandlungsansatz, aber die aussichtsreichen Ergebnisse in den experimentellen Tiermodellen verschiedener Arbeitsgruppen konnten bislang nicht in klinischen Studien verifiziert werden. Eine mögliche Erklärung ist die Schwierigkeit der Translation eines Tiermodells auf eine Patientenkohorte. Erschwerend kommt die Heterogenität der Patientenkohorte insbesondere in Bezug auf Komorbiditäten hinzu. Weitere Faktoren können die Wahl unpassender Methodik, z.B. das Tiermodell oder das Therapieziel, sein (O'Collins et al. 2006).

4.1.1 Das Tiermodell (MCAO)

Tiermodelle zur Schlaganfallforschung sind zu einem unverzichtbaren Mittel der Forschung herangereift (Kleinschnitz et al. 2015). In den *Stroke Treatment Academic Industry Roundtable* (STAIR) Kriterien, die als Handreichung für eine qualitativ hochwertige Forschung im Bereich des Schlaganfalls implementiert wurden, nehmen die Tiermodelle eine sehr wichtige Rolle ein (Fisher et al. 2009). Der ischämische Schlaganfall beim Menschen ist in seinen Erscheinungsformen, Ursachen und anatomischen Lokalisationen äußerst vielfältig, während ein experimenteller ischämischer Schlaganfall in hohem Maße reproduzierbar, gut kontrollierbar und standardisiert ist und sein muss. Nur so ist eine präzise Analyse der Pathophysiologie des Schlaganfalls und der Wirkungen von Medikamenten möglich. Das Gefäßsystem ist für die Pathophysiologie des Schlaganfalls entscheidend und lässt sich *in vitro* nicht abbilden (Kleinschnitz et al. 2015).

Die MCAO ist ein gut etabliertes Modell für die fokale Ischämie. Die fokalen Ischämie-Modelle mittels Fadenokklusion sind im Gegensatz zu den globalen Ischämie-Modellen näher an der klinischen Realität, da mit dem Versorgungsgebiet der *Art. cerebri media* die häufigste Infarktlokalisierung beim Menschen reproduziert werden kann

(Bogousslavsky et al. 1988). Es zeigt sich eine gute Steuerbarkeit, insbesondere in Bezug auf die Infarktgröße. Das Modell der transienten Okklusion kann die Reperfusion im Sinne einer Thrombolyse nach einer definierten Zeitspanne simulieren. Das Modell hat allerdings auch Nachteile. Der Verschluss der *Art. carotis externa* bleibt postoperativ bestehen, was das Ergebnis bzw. die Ischämie möglicherweise beeinflussen kann. Außerdem zeigen sich, insbesondere bei ungeübten oder unterschiedlichen Operateuren, deutliche Schwankungen der Infarktgrößen. Wir schlossen dies in einem Laserdoppler-kontrollierten (Perimed, Schweden) Vorversuch aus. Im Hauptversuch verzichteten wir aufgrund der guten Ergebnisse im Vorversuch auf die Kontrolle mittels Laserdoppler, was durch die kürzere Operationszeit und fehlende Kopfwunde zu einer Reduktion der Belastung für die Versuchstiere führen sollte. Dies ist in Bezug auf das Kraniotomie-Modell ein großer Vorteil der MCAO, man kann sie als minimalinvasiv bezeichnen und so den Nebeneffekt einer großen Wundfläche reduzieren (Kleinschnitz et al. 2015).

Die therapeutische Wirkung des rtPA ist aufgrund des fehlenden Thrombus und die „vollständige Thrombolyse“ durch das Entfernen des Fadens nach 45 min nicht beurteilbar. Als Alternative käme ein thromboembolisches Modell in Frage, allerdings ist hier die Steuerbarkeit der Infarktgröße durch die teils ineffektive Thrombolyse deutlich eingeschränkt und somit auch die Reproduzierbarkeit stark schwankend (Ren et al. 2012).

Die Versuchstiere C57 BL 6N Mäuse waren zum Zeitpunkt der MCAO 11 Wochen alt. Es muss kritisch diskutiert werden, ob eventuell Versuche mit älteren Versuchstieren eine bessere Übertragbarkeit in Bezug auf die Anwendung beim Menschen ermöglichen (Sutherland et al. 1996).

4.1.2 Intravenöse Applikation

In diesem Versuchsaufbau wurde erstmalig die intravenöse Applikation von exogenem MT-II gewählt, um die Verfügbarkeit des MT-II zu steigern. Bei bisherigen Versuchen in unserer Arbeitsgruppe erfolgte die Applikation *intraperitoneal*. Die i.v. Injektion sollte die *intrazerebrale* Verfügbarkeit verbessern, da bei der i.p. Injektion die Verfügbarkeit aufgrund der kurzen Halbwertszeit und der *renalen* Ausscheidung als verringert gilt (Lewis et al. 2012).

4.1.3 Neuroprotektive Faktoren im Versuch

4.1.3.1 Anästhesieverfahren

Die Anästhesie und Analgesie ist aus praktischen und ethischen Gründen bei der MCAO unerlässlich. Allerdings zeigen Daten verschiedener Arbeitsgruppen, dass das Ergebnis durch die gewählten Anästhesieverfahren beeinflusst werden kann (Kirsch et al. 1996; Jiang et al. 2017; Liu et al. 2020). Die Inhalationsanästhesie mit Isofluran und die Analgesie mit Buprenorphin sind in unserer Arbeitsgruppe gut etablierte Verfahren. Es gibt Studien, welche vergrößerte Infarkt volumina bei spontan atmenden Tieren unter Inhalationsanästhetika zeigen. Allerdings scheinen die Wechselwirkungen unter i.p. oder i.v. Anästhesien mit Ketamin oder Barbituraten noch höher zu sein (Macleod et al. 2005). Die besten Ergebnisse und somit geringsten Interaktionen konnten bei der mechanischen Beatmung und Inhalationsanästhesie gezeigt werden (Zausinger et al. 2002). Dies ist allerdings wenig praktikabel und mit deutlich höherem Aufwand verbunden. Es wurde nachgewiesen, dass der Effekt umso größer ist desto länger die Narkose andauert. Somit ist eine prolongierte Narkose zu vermeiden (Won et al. 2023). Die Narkosezeit wurde durch Optimierung des Eingriffs, aber auch durch das nicht Anwenden des Laserdopplers, auf ein Minimum reduziert.

4.1.3.2 Hypothermie

Hypothermie wird seit einiger Zeit als neuroprotektiver Faktor diskutiert. Nicht nur beim Schädel-Hirn-Trauma (SHT), auch nach ischämischen Insulten soll eine milde Hypothermie das *Outcome* verbessern können (Zausinger et al. 2003). Die genauen Gründe sind bislang nicht vollständig geklärt. Es soll zur Hemmung verschiedener pathologischer Reaktionen der Immunantwort kommen. Es hat sich gezeigt, dass durch die Extravasation von Neutrophilen und die Aktivierung von Mikroglia, die Entzündungsmediatoren und die freien Sauerstoffradikale reduziert werden (Huber et al. 2019). Im Versuch wurde perioperativ der Hypothermie durch eine Wärmeplatte entgegengewirkt, allerdings zeigen sich postoperativ im Kontrollintervall von 48 h sehr wohl Abfälle der Körpertemperatur, welche allerdings in allen Gruppen vergleichbar waren.

Abschließend kann man sagen, dass neuroprotektive Faktoren im Versuchsaufbau nicht vollständig zu eliminieren sind, allerdings aufgrund der Verblindung des Untersuchers und des strukturierten Versuchsaufbau alle Gruppen bzw. Versuchstiere gleichermaßen von den Faktoren beeinflusst werden.

4.1.4 Neuroscores

In der Literatur wurde häufig die fehlende Korrelation zwischen der Histologie und der eingeschränkten neurologischen Fähigkeiten beschrieben. Somit kann das Ergebnis der Zellzahlen und der Infarktmetrie nur anteilig Aufschluss über das neurologische *Outcome* geben und sollte durch funktionelle Tests genauer erörtert werden (Braeuninger und Kleinschnitz 2009; Balkaya et al. 2013). Die Einstufung erfolgte mittels Bederson-Score und mNSS. Der Bederson-Score ist wenig sensitiv und wird eher zum Nachweis des Infarkts in Hinblick auf funktionelle Defizite genutzt (Baron et al. 2013). Der mNSS überprüft die Sensomotorik und ist aus diesem Grund deutlich sensitiver. Weder im Bederson-Score noch im mNSS konnten im Versuch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Es kann somit weder in der MT-II Gruppe noch in der rtPA Gruppe eine signifikante Neuroprotektion nachgewiesen werden. Eventuell ist der Beobachtungszeitraum von 48 h nicht ausreichend. Es sind Versuchsreihen mit längeren Beobachtungszeiträumen von Nöten, um das neurologische *Outcome* sicher beurteilen zu können.

4.2 Ergebnis

4.2.1 Effekt von rtPA

Zur Beurteilung der Auswirkung von intravenöser Applikation mit rtPA nach zerebraler Ischämie wurden 48 h nach 45 min MCAO die Gehirne der operierten Versuchstiere entnommen und Infarktmetrie bestimmt. Außerdem wurden die Zellzahlen von Neuronen und aktivierter Mikroglia quantifiziert. Nach 48 h Reperfusion konnte weder in Bezug auf die makroskopischen noch auf die mikroskopischen Infarktparameter ein Unterschied zwischen den mit rtPA behandelten Versuchstieren und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Insbesondere die direkte und indirekte Infarktmetrie zeigen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die neurologischen Scores (Bederson, mNSS) weisen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf. Somit können wir weder eine neuroprotektive noch die lange Zeit proklamierte neurotoxische Wirkung bestätigen (Yepes 2015). Wir können das Ergebnis der Arbeitsgruppe Klein et al. (1999) bestätigen, da auch hier keine neurotoxische oder neuroprotektive Wirkung gezeigt werden konnte. Im Gegensatz zu unserem Versuchsaufbau erfolgte bei Klein et al. (1999) die Applikation mit der zehnfachen Dosis rtPA (10 mg/kg KG). Dies ist auf die Studie von Korninger und Collen (1981) zurückzuführen, die *in vitro* gezeigt haben, dass das fibrinolytische System der Ratte etwa zehnfach weniger empfindlich auf rtPA reagiert als das humane System und somit eine erhöhte

Dosis für Nagetiere implementierten. In dieser Arbeit richteten wir uns nach der *in vivo* Studie von Haelewyn et al. (2010), die diese These widerlegten und die gebräuchliche klinische Dosis von 0,9 mg/kg KG empfahlen.

Auffällig ist, dass in den Ergebnissen der ödematösen Schwellung ein zwar nicht signifikanter aber ein tendenzieller Unterschied zwischen der rtPA Gruppe und der Kontrollgruppe zu sehen ist. Es zeigt sich tendenziell ein kleineres Ödem in der rtPA Gruppe, was der bisherigen wissenschaftlichen Meinung widerspricht. Die Integrität der BHS soll durch die Applikation von rtPA nachhaltig gestört werden und dadurch kommt es zwangsläufig zu einer verstärkten Ödembildung, welche LRP-1 vermittelt abläuft (Yepes et al. 2003). Dies konnten wir in unserem Versuch nicht bestätigen.

Die Anzahl der Neurone zeigt analog zur Infarktvolumentrie keine signifikanten Unterschiede zwischen der rtPA Gruppe und der Kontrollgruppe. Somit geben unsere Ergebnisse auch auf dieser Ebene keinen Anhalt für ein neuroprotektives oder neurotoxisches Potential von rtPA.

Die im Vergleich zur Kontrollgruppe niedrigere Anzahl von aktivierter Mikroglia in der rtPA Gruppe widerspricht ebenfalls der in der Literatur proklamierten erhöhten Aktivität durch rtPA (Zhang et al. 2009b). In der Literatur findet man zudem immer mehr Hinweise, dass endogenes tPA im ischämischen Gehirn eine proinflammatorische Rolle einnimmt. Sowohl endogenes tPA als auch intravenös appliziertes rtPA soll den NF- κ B Signalweg in den Astrozyten aktivieren (Mehra et al. 2016). Die Inflammation scheint durch LRP vermittelt und hat eine direkte Auswirkung auf die Permeabilität der BHS (Herz 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Behandlung mit rtPA über Annexin II eine Mikroglia-Aktivierung auslöst (Uhl et al. 2014; Shi et al. 2021). Zudem fördert rtPA die Rekrutierung von Neutrophilen in das nekrotische Gewebe und kann eine hämorrhagische Transformation begünstigen (Gonias und Campana 2014; Gonias 2021). Vergleicht man den Versuchsaufbau der benannten Studien fällt auf, dass die Injektion häufig intrazerebral erfolgte, sodass eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit zu erwarten ist. Eventuell ist es von Nöten rtPA bei intravenöser Gabe repetitiv zu applizieren, um einen adäquaten intrazerebralen Wirkspiegel zu erreichen. Dies birgt das erhöhte Risiko von Blutungen und insbesondere von hämorrhagischer Transformation, würde aber die verhältnismäßig kurze Halbwertszeit und die eventuell dadurch bedingte zu niedrige intrazerebrale Bioverfügbarkeit umgehen.

Das Überleben ist zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell besser, allerdings sehen wir auch hier keine Signifikanz, sodass nicht von einer neuroprotektiven Wirkung auszugehen ist.

Die eigentliche Frage, ob die Neuroprotektion oder die Neurotoxizität vorherrscht, ist auch mit unseren Daten nicht zweifelsfrei zu beantworten. Wahrscheinlich liegt die Wahrheit irgendwo dazwischen und ist abhängig von Lokalisation der Injektion, Dosis, Infarktvolumen und Versuchstier und somit eng an den Versuchsaufbau geknüpft. Trotzdem mag man behaupten, dass die lange Zeit vertretene These der Neurotoxizität nicht bestätigt werden kann. Die wahrscheinlich größte Studie zu dieser These ist der tägliche Einsatz von rtPA im klinischen Alltag und der hier nachweislich fehlenden Toxizität (Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke 1995). Natürlich wird in Tierversuchen insbesondere der MCAO aufgrund des fehlenden Thrombus die Fähigkeit von rtPA nur anteilig wiedergegeben. Es scheint als wäre die Wirkung von rtPA nicht nur auf die Thrombolyse beschränkt, obwohl wir dies in unserem Versuch nicht nachweisen konnten (Yepes 2015).

4.2.2 Neuroprotektives Potential von Metallothionein II (MT-II)

Zur Beurteilung der Auswirkung von intravenöser Applikation mit MT-II nach zerebraler Ischämie wurden 48 h nach 45 min MCAO die Gehirne der operierten Versuchstiere entnommen und Infarktvolumina bestimmt. Außerdem wurden die Zellzahlen von Neuronen und aktivierter Mikroglia quantifiziert und zur Beurteilung des neurologischen *Outcomes* die Neuroscores bestimmt.

Der Anhaltspunkt, dass MT-II ein wichtiges Puzzleteil in der zerebralen Ischämie darstellt, stammt aus der seriellen Genanalyse in einem Standardmodell für fokale zerebrale Ischämie bei Mäusen, indem MT-II als das am stärksten induzierte Gen nach 12 Stunden nach der Reperfusion identifiziert wurde (Trendelenburg et al. 2002). Im Verlauf konnten in Schlaganfallmodellen mit transgenen Mäusen bereits gute Effekte erzielt werden (van Lookeren Campagne et al. 1999; Trendelenburg et al. 2002; Koumura et al. 2009). Daher lag der Gedanke nahe, ob eine exogene Applikation zu einer Verbesserung des neurologischen *Outcomes* führen kann.

In der direkten Infarktvolumetrie zeigt sich zwischen der MT-II Gruppe und der Kontrollgruppe kein Unterschied. Die indirekte Infarktvolumetrie veranlasst sogar zu der Annahme, dass es sich in der MT-II Gruppe tendenziell um einen größeren Infarkt handelt, allerdings ohne Signifikanz. Ein eindeutiger Anhalt für eine neuroprotektive Wirkung lassen die Infarktvolumina nicht zu. Es kann viele Gründe hierfür geben, neben der Dosis und der Bioverfügbarkeit, kann auch das Modell mit 45 min und nur 48 h Nachbeobachtungszeitraum die neuroprotektive Wirkung maskieren. So konnte in unserer Arbeitsgruppe in einem

milden Modell mit 30 min Verschlussdauer und 72 h Reperfusion eine Neuroprotektion gezeigt werden (Eidizadeh et al. 2015).

Interessant ist das Ergebnis der ödematösen Schwellung, so lässt sich hier eine Tendenz zu einer verringerten Ödembildung im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen, was mit der Literatur im Einklang steht (Dai et al. 2021; Tang et al. 2022). Allerdings zeigt sich auch hier kein signifikantes Ergebnis.

Die neurologischen Scores (Bederson, mNSS) zeigen keine signifikanten Unterschiede. Man muss aber kritisch anmerken, dass die neurologischen Testungen der MT-II Gruppe breiter gestreut sind und somit auch Versuchstiere mit tendenziell schlechterem Neuroscore als die Kontrollgruppe beinhalten. Dies liegt vermutlich an der Tatsache, dass in der MT-II Gruppe alle Versuchstiere überlebt haben und sich somit zwar ein besseres Überleben zeigt, allerdings kein besseres neurologisches *Outcome* bei Betrachtung der gesamten Gruppe.

Die Anzahl der Neurone verhält sich analog zum direkten Infarkt volumen und es besteht kein Unterschied zwischen der MT-II Gruppe und der Kontrollgruppe.

In der Iba1-Färbung zeigen sich tendenziell weniger aktivierte Zellen der Mikroglia in der MT-II Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies konnten wir in der Versuchsreihe mit dem milden Modell von 30 min und i.p. Injektion interessanterweise auch beobachten (Eidizadeh et al. 2015). Dieses Ergebnis ist nicht signifikant. Trotzdem ist der Einfluss bzw. die Hemmung der Aktivität der Mikroglia eine mögliche Erklärung für den Wirkmechanismus von MT-II (Chung et al. 2009). Der Signalweg, über welchen die Interaktion abläuft, bleibt allerdings unklar. Als mögliche Erklärung werden die LRP-Rezeptoren diskutiert (West et al. 2011). In einem Experiment in unserer Arbeitsgruppe konnte die Hemmung von TNF- α nach MCAO und Applikation von MT-II festgestellt werden. Dies bestätigt die immunmodulierende Wirkung von MT-II. Die Fähigkeit der Makrophagen, die Proliferation der T-Zellen zu stimulieren, wird gehemmt (Yin et al. 2005; Eidizadeh et al. 2015).

In der Überlebenskurve zeigt sich ein signifikantes Überleben ($p = 0,019$) aller Versuchstiere, die mit MT-II behandelt worden sind. Den genauen Grund und somit den Mechanismus für den Überlebensvorteil nach MT-II Injektion kann man nur mutmaßen, aber es bestätigt unseren Verdacht, dass Metallothionein eine entscheidende Rolle im Schutzmechanismus der Zellen einnimmt (Edmands und Hall 2009). Eine andere Arbeitsgruppe konnte die signifikant erhöhte Überlebensrate bei älteren transgenen MT-I Mäusen beobachten (Malavolta et al. 2012). Zudem konnte der Rückgang der Überlebensrate bei MT-III defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Koumura et al. 2009). Dies lässt die Annahme zu, dass

MT-II in der zerebralen Ischämie ebenfalls eine überlebensfördernde Wirkung zukommt. Unterstützt wird diese These durch Ergebnisse aus anderen Tiermodellen. So zeigt sich der Überlebensvorteil bei transgenen MT-II Mäusen sowohl in einem Modell zur akuten Lungenschädigung als auch in einem Modell für kardiale Dysfunktion (Wesselkamper et al. 2006; Yang et al. 2006). In Zusammenschau der Studien lässt sich so eine entscheidende Rolle von MT in Bezug auf das Überleben und den Alterungsprozess annehmen (Swindell 2011).

Die neuroprotektive Wirkung konnte im für diese Arbeit durchgeführten Versuch nicht zweifelsfrei bewiesen werden. Wir vermuten, dass die Bioverfügbarkeit von MT-II ein ausschlaggebender Faktor in der potenziellen therapeutischen Anwendung ist. Die einmalige Substitution scheint nicht ausreichend und wird zu schnell renal eliminiert, sodass das in Versuchen mit transgenen MT-II Mäusen neuroprotektive Potential nicht erreicht wird (Lewis et al. 2012). Es gibt verschiedene Lösungsansätze. Man könnte exogenes MT-II, wie beispielweise in vielen rtPA-Tierversuchen, direkt intrazerebral applizieren und hiermit sowohl die Bioverfügbarkeit lokal erhöhen als auch der Problematik, dass MT-II die BHS nicht passieren kann, entgegenwirken (Giralt et al. 2002; Lewis et al. 2012). Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Steigerung der Einzeldosis oder die repetitive Substitution von MT-II. Unsere Dosis stammt aus dem für unsere Arbeitsgruppe durchgeführten *in vitro* Versuch (Eidizadeh et al. 2015). In der Zukunft sind Versuchsreihen zur Ermittlung der Dosis-Wirkung-Beziehung sinnvoll, da das Ergebnis der Überlebenskurve vermutlich nur ein Teil des Potentials von MT-II beschreibt.

4.2.3 Kombinierte Gabe von rtPA und MT-II

Zur Beurteilung der Auswirkung von intravenöser Applikation mit der Kombination aus MT-II und rtPA nach zerebraler Ischämie wurden 48 h nach 45 min MCAO die Gehirne der operierten Versuchstiere entnommen und Infarktvolumina bestimmt. Außerdem wurden die Zellzahlen von Neuronen und aktivierter Mikroglia quantifiziert.

Die kombinierte Gabe von rtPA und MT-II sollte in unserem Versuch nah an einem klinischen Einsatz angelehnt sein. Aufgrund der lang vorherrschenden Meinung, dass rtPA neurotoxisch sei, erhofften wir uns von der kombinierten Gabe eine Verbesserung des neurologischen *Outcomes*. Wie in 4.2.1 dargestellt, zeigte rtPA in unserem Versuch keinen neurotoxischen Charakter, somit konzentrierten wir uns auf mögliche Wechselwirkungen bei der kombinierten Gabe.

In der direkten und indirekten Infarktvolumetrie sahen wir in Bezug auf alle Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Allenfalls lässt sich kritisch anmerken, dass die indirekte

Infarkt volumetrie tendenziell im Vergleich zu allen anderen Gruppen am größten war. Einen konkreten Anhalt, dass die kombinierte Gabe eine neurotoxische oder neuroprotektive Wirkung hat, bestand aber nicht.

In der Statistik der ödematösen Schwellung zeigt sich die niedrigste Ödembildung in der kombinierten Gabe im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Allerdings auch hier ohne einen signifikanten Unterschied. Schaut man sich die einzelnen Versuchstiere an, fällt eine sehr breite Streuung in der rtPA/MT-II Gruppe auf, sowohl das Versuchstier mit der stärksten als auch das Versuchstier mit der niedrigsten Ödembildung sind in der rtPA/MT-II Gruppe beheimatet.

Die neurologischen Scores (Bederson, mNSS) weisen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf. Allerdings muss man hier ebenfalls kritisch anmerken, dass die Verteilung insbesondere im mNSS tendenziell mehr Versuchstiere mit einem schlechten Score aufweist. Dies lässt sich wie in der MT-II Gruppe mit dem Überleben erklären, da auch in der rtPA/MT-II Gruppe alle Versuchstiere überlebt haben.

Die Anzahl der Neurone ist wie in den übrigen Gruppen nicht signifikant verändert und somit passend zum Infarktvolumen.

In der rtPA/MT-II Gruppe ist die Anzahl von aktivierter Mikroglia auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Man kann nur mutmaßen, wieso der Effekt mit der reduzierten Anzahl von aktivierter Mikroglia der MT-II Gruppe nicht in der rtPA/MT-II zum Tragen kommt und über der Anzahl der rtPA Gruppe liegt. Eventuell kommt es hier zu einem kompetitiven Antagonismus in Bezug auf den LRP-Rezeptor, allerdings widerspricht die niedrige ödematöse Schwellung und das Überleben dieser Theorie.

In der Überlebenskurve der rtPA/MT-II Gruppe kann man ein signifikantes Überleben ($p = 0,019$) im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Somit haben alle Versuchstiere die MT-II erhalten haben überlebt. Am wahrscheinlichsten ist der Effekt als Antioxidans von MT-II für das Überleben ursächlich, allerdings spiegelt sich dies mit Ausnahme der Tendenz in der niedrigen Ödembildung weder in der Infarkt volumetrie, der Neuroscores noch auf die Zellzahlen wider.

Vergleiche zu anderen Arbeitsgruppen lassen sich bei diesem Versuchsteil nicht ziehen, da die kombinierte Gabe von rtPA und MT-II bislang einmalig ist. Man kann allerdings andere Kombinationstherapien zum Vergleich heranziehen, so wurden bereits klinische Studien mit Minocyclin, Fingolimod und Harnsäure in Kombination mit rtPA durchgeführt (Zhou et al. 2017). In der Theorie verstärkt die Thrombolyse die therapeutische Wirkung des

neuroprotektiven Mittels, da der Sauerstoff- und Nährstoffmangel durch die Wiederherstellung des Blutflusses gebannt wird und so das Überleben der Neurone und die Regeneration der *Penumbra* maßgeblich gesichert wird. Der zusätzliche Benefit ist die Verringerung der reperfusionsbedingten Neurotoxizität, insbesondere das abmildern der schädigenden Wirkung eingeschwemmter ROS (Gürsoy-Özdemir et al. 2004).

Die bisherigen Studien zeigen alle nicht den erwünschten Effekt, das mag daran liegen, dass die zerebrale Ischämie eine komplexe Abfolge von Reaktionen mit sich bringt und vermutlich ein Eingreifen in den Prozess an mehreren Punkten bedarf. So kann man eventuell durch die Kombination mehrerer neuroprotektiver Medikamente ein besseres neurologisches *Outcome* erreichen.

Seit 2001 ist das Medikament Edavarone als Radikalfänger in der Schlaganfalltherapie in Japan zugelassen (Yamamoto 2017). Trotz der langen Zulassung fehlen bis heute überzeugende Daten, die eine Zulassung in Deutschland rechtfertigen würden (Chen et al. 2021).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Übertragung der Therapie aus dem Tiermodell in die klinische Therapie sich als sehr schwierig gestaltet. Nicht ohne Grund wurden die STAIR Kriterien zur Verbesserung der Forschung eingeführt (Fisher et al. 2009). Die Komorbiditäten, das Alter der Patienten und die Komplexität der zerebralen Ischämie mit der zeitlich begrenzten Therapiemöglichkeit sind sicherlich ursächlich, dass dem Forschungsbereich Schlaganfall in Zukunft noch viel Aufmerksamkeit gewidmet werden muss.

4.3 Schlussfolgerung und Relevanz der Ergebnisse

In unseren Ergebnissen sehen wir keinen Anhalt auf eine neurotoxische Wirkung von rtPA, allerdings sehen wir auch keine Neuroprotektion, die in der aktuellen Literatur diskutiert wird (Yepes 2015). Der rekombinante Plasminogenaktivator (rtPA) ist weiterhin das einzige Medikament in der Schlaganfalltherapie in der westlichen Welt und wird überall auf der Welt angewendet. Somit sind die Ergebnisse zur fehlenden neurotoxischen Wirkung beruhigend und werden durch den regelmäßigen klinischen Gebrauch bestätigt.

Die Ergebnisse in Bezug auf MT-II von Infarktvolumetrie, Ödembildung, Zellzahlen und neurologischer Tests lassen Spielraum für Interpretationen. Allerdings muss man kritisch feststellen, dass es sich bei den Unterschieden zwischen den Gruppen nur um Tendenzen handelt und somit kein Beweis erbracht wurde, dass in einer der Gruppen eine Neuroprotektion oder Neurotoxizität besteht.

Eine Ausnahme ist das Überleben! Es zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil für alle Versuchstiere, die mit MT-II behandelt wurden. Den Grund für diesen Überlebensvorteil bleiben wir mit unserem Versuch schuldig. Weder eine signifikante Verringerung der Infarktgröße noch eine signifikante antiinflammatorische Wirkung können wir nachweisen. Trotzdem muss und ist das Verbessern des Überlebens das primäre Ziel einer jeden Therapie. Man muss aber auch das neurologische *Outcome* kritisch beurteilen, so sind die Versuchstiere zwar nicht signifikant schlechter, aber die Streuung von sehr schlecht bis sehr gut ist breiter als in der Kontrollgruppe.

In der Zukunft könnte Metallothionein eine Rolle in einem Therapiekonzept für zerebrale Ischämie spielen. Hierfür müssen wir die Fähigkeiten von Metallothionein noch besser verstehen und dies wird nur durch weitere Studien möglich sein. So muss die Bioverfügbarkeit und die Dosis-Wirkungs-Beziehung genauer erschlossen werden. Langzeitstudien zur Überprüfung des neurologischen *Outcomes* und zur Bestätigung des Überlebensvorteils sind von Nöten.

Wenn MT-II unter den genannten Voraussetzungen den Anforderungen standhält, zählt es definitiv zu den Kandidaten, vielleicht in Kombination mit rtPA, die den Einzug in die klinische Schlaganfalltherapie bewältigen können.

5 Zusammenfassung

Der Schlaganfall ist die zweithäufigste Todesursache weltweit. Die einzige medikamentöse Therapie ist die Thrombolyse mittels rekombinatem gewebspezifischem Plasminogenaktivator (rtPA), die aufgrund des Zeitfensters von 4,5 h nur begrenzt eingesetzt werden kann. Die medikamentöse neuroprotektive Therapie ist ein Ansatzpunkt zur Verbesserung des neurologischen *Outcomes*. In der vorliegenden Arbeit wird das neuroprotektive Potential von intravenös appliziertem Metallothionein-II unter Thrombolyse mit rtPA bei zerebraler Ischämie mittels 45 min MCAO und 48 h Reperfusion untersucht.

Metallothionein ist ein ubiquitär exprimiertes Protein mit niedrigem Molekulargewicht, welches bei hypoxisch stressinduzierter Inflammation eine Hochregulation erfährt. Es zeigt Eigenschaften als Antioxidans und ein MT-II Mangel führt zur Steigerung von ischämischer Schädigung *in vitro* und *in vivo*.

Die direkte und indirekte Infarkt volumetrie, die ödematöse Schwellung sowie die immunhistochemischen Färbungen basierend auf der Quantifizierung von NeuN- und Iba1-positiven Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Neuroscores, der Bederson Score sowie der *modified Neurological Severity Score* (mNSS), waren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich.

In der Überlebensstatistik sehen wir ein signifikantes Überleben aller Versuchstiere, die mit MT-II behandelt worden sind einschließlich der Versuchstiere, die mit der Kombination aus rtPA und MT-II behandelt wurden.

Es sind in unserem Versuchsaufbau weder für MT-II noch für rtPA neuroprotektive oder neurotoxische Wirkmechanismen nachweisbar, obwohl der Überlebensvorteil für MT-II applizierte Tiere ein verheißungsvoller Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen ist.

7 Literaturverzeichnis

- Abe Y, Nakamura H, Yoshino O, Oya T, Kimura T (2003): Decreased Neural Damage after Spinal Cord Injury in tPA-Deficient Mice. *J Neurotrauma* 20, 43–57
- Adamo AM, Zago MP, Mackenzie GG, Aimo L, Keen CL, Keenan A, Oteiza PI (2010): The Role of Zinc in the Modulation of Neuronal Proliferation and Apoptosis. *Neurotox Res* 17, 1–14
- Ambjørn M, Asmussen JW, Lindstam M, Gotfryd K, Jacobsen C, Kiselyov VV, Moestrup SK, Penkowa M, Bock E, Berezin V (2008): Metallothionein and a peptide modeled after metallothionein, EmtinB, induce neuronal differentiation and survival through binding to receptors of the low-density lipoprotein receptor family. *J Neurochem* 104, 21–37
- Asmussen JW, Von Sperling ML, Penkowa M (2009a): Intraneuronal signaling pathways of metallothionein. *J Neurosci Res* 87, 2926–2936
- Asmussen JW, Ambjørn M, Bock E, Berezin V (2009b): Peptides modeled after the α -domain of metallothionein induce neurite outgrowth and promote survival of cerebellar granule neurons. *Eur J Cell Biol* 88, 433–443
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L (1981): Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723–725
- Baba H, Tsuneyama K, Yazaki M, Nagata K, Minamisaka T, Tsuda T, Nomoto K, Hayashi S, Miwa S, Nakajima T, et al. (2013): The liver in itai-itai disease (chronic cadmium poisoning): pathological features and metallothionein expression. *Mod Pathol* 26, 1228–1234
- Balkaya M, Kröber JM, Rex A, Endres M (2013): Assessing Post-Stroke Behavior in Mouse Models of Focal Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 330–338
- Baron J-C, Macrae IM, Adams HP, Dirnagl U (2013): ESC-BRAIN: Experimental and Clinical Stroke Research - Do They Connect? *Cerebrovasc Dis* 36, 306–321
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986): Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17, 472–476
- Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH (1984): Elevation of the Extracellular Concentrations of Glutamate and Aspartate in Rat Hippocampus During Transient Cerebral Ischemia Monitored by Intracerebral Microdialysis. *J Neurochem* 43, 1369–1374
- Bertrand T, Lesept F, Chevilly A, Lenoir S, Aimable M, Briens A, Hommet Y, Bardou I, Parcq J, Vivien D (2015): Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell Death Dis* 6, e1924

- Blaauwgeers HGT, Chand MA, van den Berg FM, Vianney de Jong JMB, Troost D (1996): Expression of different metallothionein messenger ribonucleic acids in motor cortex, spinal cord and liver from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 142, 39–44
- Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F (1988): The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* 19, 1083–1092
- Braeuninger S, Kleinschnitz C (2009): Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Exp Transl Stroke Med* 1, 8
- Callaway E (2012): Danish neuroscientist challenges fraud findings. *Nature* 2012, 11146
- Carrasco J, Penkowa M, Hadberg H, Molinero A, Hidalgo J (2000): Enhanced seizures and hippocampal neurodegeneration following kainic acid-induced seizures in metallothionein-I + II-deficient mice: MT-I + II: role in seizure-induced neurodegeneration. *Eur J Neurosci* 12, 2311–2322
- Chen C, Li M, Lin L, Chen S, Chen Y, Hong L (2021): Clinical effects and safety of edaravone in treatment of acute ischaemic stroke: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Pharm Ther* 46, 907–917
- Chung RS, Penkowa M, Dittmann J, King CE, Bartlett C, Asmussen JW, Hidalgo J, Carrasco J, Leung YKJ, Walker AK, et al. (2008): Redefining the Role of Metallothionein within the Injured Brain. *J Biol Chem* 283, 15349–15358
- Chung RS, Leung YK, Butler CW, Chen Y, Eaton ED, Pankhurst MW, West AK, Guillemin GJ (2009): Metallothionein Treatment Attenuates Microglial Activation and Expression of Neurotoxic Quinolinic Acid Following Traumatic Brain Injury. *Neurotox Res* 15, 381–389
- Collen D (2001): Ham-Wasserman Lecture: Role of the Plasminogen System in Fibrin-Homeostasis and Tissue Remodeling. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2001, 1–9
- Comes G, Fernandez-Gayol O, Molinero A, Giralt M, Capdevila M, Atrian S, Hidalgo J (2019): Mouse metallothionein-1 and metallothionein-2 are not biologically interchangeable in an animal model of multiple sclerosis, EAE. *Metallomics* 11, 327–337
- Dai H, Wang L, Li L, Huang Z, Ye L (2021): Metallothionein 1: A New Spotlight on Inflammatory Diseases. *Front Immunol* 12, 739918
- Diaz-Ruiz A, Vacio-Adame P, Monroy-Noyola A, Méndez-Armenta M, Ortiz-Plata A, Montes S, Rios C (2014): Metallothionein-II Inhibits Lipid Peroxidation and Improves Functional Recovery after Transient Brain Ischemia and Reperfusion in Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 1–7
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391–397
- DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP (2016): Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem* 139, 136–153

- Ebadi M, Perini F, Mountjoy K, Garvey JS (1996): Amino Acid Composition, Immunoreactivity, Sequence Analysis, and Function of Bovine Hippocampal Metallothionein Isoforms. *J Neurochem* 66, 2121–2127
- Echeverry R, Wu J, Haile WB, Guzman J, Yepes M (2010): Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *J Clin Invest* 120, 2194–2205
- Edmands SD, Hall AC (2009): Role for metallothioneins-I/II in isoflurane preconditioning of primary murine neuronal cultures. *Anesthesiology* 110, 538–547
- Eidizadeh A, Khajehalichalehshtari M, Freyer D, Trendelenburg G (2015): Assessment of the Therapeutic Potential of Metallothionein-II Application in Focal Cerebral Ischemia In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 10, e0144035
- Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V (2011): Modeling Stroke in Mice - Middle Cerebral Artery Occlusion with the Filament Model. *J Vis Exp* e2423
- Feigin VL, Stark BA, Johnson CO, Roth GA, Bisignano C, Abady GG, Abbasifard M, Abbasi-Kangevari M, Abd-Allah F, Abedi V, et al. (2021): Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol* 20, 795–820
- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH (2009): Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations. *Stroke* 40, 2244–2250
- Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, Kawase M, Chan PH (1998): Cytosolic Redistribution of Cytochrome C after Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 1239–1247
- Garcia JH, Wagner S, Liu K-F, Hu X (1995): Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats: Statistical Validation. *Stroke* 26, 627–635
- Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe C-U, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T (2009): Temporal and Spatial Dynamics of Cerebral Immune Cell Accumulation in Stroke. *Stroke* 40, 1849–1857
- Gelderblom M, Neumann M, Ludewig P, Bernreuther C, Krasemann S, Arunachalam P, Gerloff C, Glatzel M, Magnus T (2013): Deficiency in Serine Protease Inhibitor Neutrosperin Exacerbates Ischemic Brain Injury by Increased Postischemic Inflammation. *PLoS One* 8, e63118
- Giralt M, Penkowa M, Lago N, Molinero A, Hidalgo J (2002): Metallothionein-1+2 Protect the CNS after a Focal Brain Injury. *Exp Neurol* 173, 114–128
- Gonias SL (2021): Plasminogen activator receptor assemblies in cell signaling, innate immunity, and inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol* 321, C721–C734
- Gonias SL, Campana WM (2014): LDL Receptor-Related Protein-1: a regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous system. *Am J Pathol* 184, 18–27

- González RG (2006): Imaging-guided acute ischemic stroke therapy: From „time is brain“ to „physiology is brain“. *AJNR Am J Neuroradiol* 27, 728–735
- Gürsoy-Özdemir Y, Can A, Dalkara T (2004): Reperfusion-Induced Oxidative/Nitrative Injury to Neurovascular Unit After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 35, 1449–1453
- Haelewyn B, Risso J-J, Abraini JH (2010): Human Recombinant Tissue-Plasminogen Activator (Alteplase): Why Not Use the ‘Human’ Dose for Stroke Studies in Rats? *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 900–903
- Haile WB, Wu J, Echeverry R, Wu F, An J, Yepes M (2012): Tissue-Type Plasminogen Activator has a Neuroprotective Effect in the Ischemic Brain Mediated by Neuronal TNF- α . *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 57–69
- Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA (1996): Reduced Brain Edema and Infarction Volume in Mice Lacking the Neuronal Isoform of Nitric Oxide Synthase after Transient MCA Occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 605–611
- Harhausen D, Khojasteh U, Stahel PF, Morgan BP, Nietfeld W, Dirnagl U, Trendelenburg G (2010): Membrane attack complex inhibitor CD59a protects against focal cerebral ischemia in mice. *J Neuroinflammation* 7, 15
- Hatano S (1976): Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report. *Bull World Health Organ* 54, 541–553
- Herz J (2003): LRP: a bright beacon at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 112, 1483–1485
- Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vašák M (2001): Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull* 55, 133–145
- Hossmann KA (1996): Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8, 195–208
- Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D (1982): Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* 257, 2912–2919
- Huber C, Huber M, Ding Y (2019): Evidence and opportunities of hypothermia in acute ischemic stroke: Clinical trials of systemic versus selective hypothermia. *Brain Circ* 5, 195–202
- Hübner C, Haase H (2021): Interactions of zinc- and redox-signaling pathways. *Redox Biol* 41, 101916
- Iadecola C, Anrather J (2011): The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17, 796–808
- Iijima T, Mies G, Hossmann K-A (1992): Repeated Negative DC Deflections in Rat Cortex following Middle Cerebral Artery Occlusion are Abolished by MK-801: Effect on Volume of Ischemic Injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 12, 727–733
- Inoue K, Takano H, Shimada A, Satoh M (2009): Metallothionein as an Anti-Inflammatory Mediator. *Mediators Inflamm* 2009, 1–7

- Inoue K-I, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Ichinose T, Sadakane K, Hiyoshi K, Sato M, Shimada A, Inoue M, Yoshikawa T (2005): Role of Metallothionein in Antigen-Related Airway Inflammation. *Exp Biol Med (Maywood)* 230, 75–81
- Jakovac H, Stašić N, Krašević M, Jonjić N, Radošević-Stašić B (2021): Expression profiles of metallothionein-I/II and megalin/LRP-2 in uterine cervical squamous lesions. *Virchows Arch* 478, 735–746
- Jeanneret V, Wu F, Merino P, Torre E, Diaz A, Cheng L, Yepes M (2016): Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) Modulates the Postsynaptic Response of Cerebral Cortical Neurons to the Presynaptic Release of Glutamate. *Front Mol Neurosci* 9, 121
- Jiang M, Sun L, Feng D, Yu Z, Gao R, Sun Y, Chen G (2017): Neuroprotection provided by isoflurane pre-conditioning and post-conditioning. *Med Gas Res* 7, 48–55
- Jurcau A, Simion A (2022): Neuroinflammation in Cerebral Ischemia and Ischemia/Reperfusion Injuries: From Pathophysiology to Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci* 23, 14
- Kawano T, Morimoto K, Uemura Y (1968): Urokinase Inhibitor in Human Placenta. *Nature* 217, 253–254
- Kelly EJ, Palmiter RD (1996): A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nat Genet* 13, 219–222
- Kirsch JR, Traystman RJ, Hurn PD (1996): Anesthetics and Cerebroprotection: Experimental Aspects. *Int Anesthesiol Clin* 34, 73–94
- Klein GM, Li H, Sun P, Buchan AM (1999): Tissue plasminogen activator does not increase neuronal damage in rat models of global and focal ischemia. *Neurology* 52, 1381
- Kleinschnitz C, Fluri F, Schuhmann M (2015): Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Design, Development and Therapy* 3445
- Korninger C, Collen D (1981): Studies on the specific fibrinolytic effect of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in human blood and in various animal species in vitro. *Thromb Haemost* 46, 561–565
- Koumura A, Hamanaka J, Shimazawa M, Honda A, Tsuruma K, Uchida Y, Hozumi I, Satoh M, Inuzuka T, Hara H (2009): Metallothionein-III knockout mice aggravates the neuronal damage after transient focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1292, 148–154
- Krystosek A, Seeds NW (1981): Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7810–7814
- Lebeurrier N, Liot G, Lopez-Atalaya JP, Orset C, Fernandez-Monreal M, Sonderegger P, Ali C, Vivien D (2005): The brain-specific tissue-type plasminogen activator inhibitor, neuroserpin, protects neurons against excitotoxicity both in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci* 30, 552–558
- Lee SH, Ko HM, Kwon KJ, Lee J, Han S-H, Han DW, Cheong JH, Ryu JH, Shin CY (2014): tPA Regulates Neurite Outgrowth by Phosphorylation of LRP5/6 in Neural Progenitor Cells. *Mol Neurobiol* 49, 199–215

- Lee S-J, Koh J-Y (2010): Roles of zinc and metallothionein-3 in oxidative stress-induced lysosomal dysfunction, cell death, and autophagy in neurons and astrocytes. *Mol Brain* 3, 30
- Leist M, Nicotera P (1998): Apoptosis, Excitotoxicity, and Neuropathology. *Exp Cell Res* 239, 183–201
- Levene HB, Zhang M, Erb CJ, Jallo JI, Loftus CM, Tuma RF (2007): Method to perform IV injections on mice using the facial vein. *J Neurosci Methods* 164, 304–307
- Lewis KE, Chung RS, West AK, Chuah MI (2012): Distribution of exogenous metallothionein following intraperitoneal and intramuscular injection of metallothionein-deficient mice. *Histol Histopathol* 27, 1459–1470
- Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu Y-X, Zhang Z (2000): Intrastriatal Transplantation of Bone Marrow Nonhematopoietic Cells Improves Functional Recovery After Stroke in Adult Mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 1311–1319
- Linnik MD, Miller JA, Sprinkle-Cavallo J, Mason PJ, Thompson FY, Montgomery LR, Schroeder KK (1995): Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. *Brain Res Mol Brain Res* 32, 116–124
- Liu J, Tan S, Wang Y, Luo J, Long Y, Mei X, Tang Y (2020): Role of Metallothionein-1 and Metallothionein-2 in the Neuroprotective Mechanism of Sevoflurane Preconditioning in Mice. *J Mol Neurosci* 70, 713–723
- Lopez-Atalaya JP, Roussel BD, Levrat D, Parcq J, Nicole O, Hommet Y, Benchenane K, Castel H, Leprince J, To Van D, et al. (2008): Toward Safer Thrombolytic Agents in Stroke: Molecular Requirements for NMDA Receptor-Mediated Neurotoxicity. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1212–1221
- Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan PJ, Wren P (2013): BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 14, 401–416
- MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL (1986): NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321, 519–522
- Macleod MR, O'Collins T, Horvath LL, Howells DW, Donnan GA (2005): Systematic Review and Metaanalysis of the Efficacy of FK506 in Experimental Stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 713–721
- Macrez R, Ortega MC, Bardou I, Mehra A, Fournier A, Van der Pol SMA, Haelewyn B, Maubert E, Lesept F, Chevilly A, et al. (2016): Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 139, 2406–2419
- Malavolta M, Basso A, Piacenza F, Giacconi R, Costarelli L, Pierpaoli S, Mocchegiani E (2012): Survival Study of Metallothionein-1 Transgenic Mice and Respective Controls (C57BL/6J): Influence of a Zinc-Enriched Environment. *Rejuvenation Res* 15, 140–143

- Margoshes M, Vallee BL (1957): A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 79, 4813–4814
- Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmiter RD (1994): Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 584–588
- Mehra A, Ali C, Parcq J, Vivien D, Docagne F (2016): The plasminogen activation system in neuroinflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1862, 395–402
- Michalska AE, Choo KH (1993): Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8088–8092
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA (1993): Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4, 709–711
- Monteith AJ, Miller JM, Maxwell CN, Chazin WJ, Skaar EP (2021): Neutrophil extracellular traps enhance macrophage killing of bacterial pathogens. *Sci Adv* 7, eabj2101
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010): The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. *Neuron* 67, 181–198
- Müller T (2017): Schlaganfall: Versorgung geht neue Wege. *CME (Berl)* 14, 51
- Nagai N, De Mol M, Lijnen HR, Carmeliet P, Collen D (1999): Role of Plasminogen System Components in Focal Cerebral Ischemic Infarction: A Gene Targeting and Gene Transfer Study in Mice. *Circulation* 99, 2440–2444
- Nakazato K, Tomioka S, Nakajima K, Saito H, Kato M, Kodaira T, Yatsuzuka S, Shimomura Y, Hiroki T, Motoyama K, et al. (2014): Determination of the serum metallothionein (MT)1/2 concentration in patients with Wilson’s disease and Menkes disease. *J Trace Elem Med Biol* 28, 441–447
- Nordberg GF, Piscator M, Lind B (1971): Distribution of cadmium among protein fractions of mouse liver. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 29, 456–470
- O’Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horvath LL, van der Worp BH, Howells DW (2006): 1,026 Experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 59, 467–477
- Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD (2006): Experimental Stroke Induces Massive, Rapid Activation of the Peripheral Immune System. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 654–665
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung W-H, Hempstead BL, Lu B (2004): Cleavage of proBDNF by tPA/Plasmin Is Essential for Long-Term Hippocampal Plasticity. *Science* 306, 487–491
- Pedersen MØ, Jensen R, Pedersen DS, Skjolding AD, Hempel C, Maretty L, Penkowa M (2009a): Metallothionein-I+II in neuroprotection. *BioFactors* 35, 315–325
- Pedersen MØ, Larsen A, Stoltenberg M, Penkowa M (2009b): The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog Histochem Cytochem* 44, 29–64

- Penkowa M, Moos T (1995): Disruption of the blood-brain interface in neonatal rat neocortex induces a transient expression of metallothionein in reactive astrocytes. *Glia* 13, 217–227
- Penkowa M, Carrasco J, Giralt M, Moos T, Hidalgo J (1999): CNS Wound Healing Is Severely Depressed in Metallothionein I- and II-Deficient Mice. *J Neurosci* 19, 2535–2545
- Ren M, Lin Z-J, Qian H, Choudhury GR, Liu R, Liu H, Yang S-H (2012): Embolic middle cerebral artery occlusion model using thrombin and fibrinogen composed clots in rat. *J Neurosci Methods* 211, 296–304
- Ringleb P, Köhrmann M, Jansen O (2022): Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls, S2e-Leitlinie, 2022, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/dgn.org/leitlinie/akuttherapie-des-ischamischen-schlaganfalls; abgerufen am 30.07.2023.
- Robbins AH, McRee DE, Williamson M, Collett SA, Xuong NH, Furey WF, Wang BC, Stout CD (1991): Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* 221, 1269–1293
- Rosenberg GA (2002): Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39, 279–291
- Ross AM, Hurn P, Perrin N, Wood L, Carlini W, Potempa K (2007): Evidence of the Peripheral Inflammatory Response in Patients With Transient Ischemic Attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 16, 203–207
- Santos CRA, Martinho A, Quintela T, Gonçalves I (2012): Neuroprotective and neuroregenerative properties of metallothioneins. *IUBMB Life* 64, 126–135
- Schaeffer S, Iadecola C (2021): Revisiting the neurovascular unit. *Nat Neurosci* 24, 1198–1209
- Seeds NW, Basham ME, Haffke SP (1999): Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14118–14123
- Sena ES, Briscoe CL, Howells DW, Donnan GA, Sandercock PA, Macleod MR (2010): Factors Affecting the Apparent Efficacy and Safety of Tissue Plasminogen Activator in Thrombotic Occlusion Models of Stroke: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 1905–1913
- Shi K, Zou M, Jia D-M, Shi S, Yang X, Liu Q, Dong J, Sheth KN, Wang X, Shi F-D (2021): tPA Mobilizes Immune Cells That Exacerbate Hemorrhagic Transformation in Stroke. *Circ Res* 128, 62–75
- Shinji K, Noriko O, Junzo S, Fuminori O (1993): Analysis of mammalian metallothionein isoforms by high-resolution SDS-gel electrophoresis. *Toxicol Lett* 66, 165–174
- Si M, Lang J (2018): The roles of metallothioneins in carcinogenesis. *J Hematol Oncol* 11, 107
- Simats A, Liesz A (2022): Systemic inflammation after stroke: implications for post-stroke comorbidities. *EMBO Mol Med* 14, e16269

- Sprengers E, Kluft C (1987): Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 69, 381–387
- Stevens SL, Bao J, Hollis J, Lessov NS, Clark WM, Stenzel-Poore MP (2002): The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 932, 110–119
- Sun M-S, Jin H, Sun X, Huang S, Zhang F-L, Guo Z-N, Yang Y (2018): Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2018, 3804979
- Sutherland GR, Dix GA, Auer RN (1996): Effect of Age in Rodent Models of Focal and Forebrain Ischemia. *Stroke* 27, 1663–1668
- Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR (1990): A Semiautomated Method for Measuring Brain Infarct Volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 10, 290–293
- Swindell WR (2011): Metallothionein and the biology of aging. *Ageing Res Rev* 10, 132–145
- Tang W, Chai W, Du D, Xia Y, Wu Y, Jiang L, Cheng C, Guo Z, Sun X, Huang Z, Zhong J (2022): The lncRNA-AK046375 Upregulates Metallothionein-2 by Sequestering miR-491-5p to Relieve the Brain Oxidative Stress Burden after Traumatic Brain Injury. *Oxid Med Cell Longev* 2022, 8188404
- Tang Y, Le W (2016): Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53, 1181–1194
- Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke (1995) *N Engl J Med* 333, 1581–1588
- Trendelenburg G, Prass K, Priller J, Kapinya K, Polley A, Muselmann C, Ruscher K, Kannbley U, Schmitt AO, Castell S, et al. (2002): Serial Analysis of Gene Expression Identifies Metallothionein-II as Major Neuroprotective Gene in Mouse Focal Cerebral Ischemia. *J Neurosci* 22, 5879–5888
- Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S (1995): Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377, 340–344
- Turc G, Bhogal P, Fischer U, Khatri P, Lobotesis K, Mazighi M, Schellinger PD, Toni D, de Vries J, White P, Fiehler J (2019): European Stroke Organisation (ESO) – European Society for Minimally Invasive Neurological Therapy (ESMINT) Guidelines on Mechanical Thrombectomy in Acute Ischaemic Stroke Endorsed by Stroke Alliance for Europe (SAFE). *Eur Stroke J* 4, 6–12
- Türeyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Dempsey RJ (2004): Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. *J Neurosci Methods* 139, 203–207
- Uhl B, Zuchtriegel G, Pühr-Westerheide D, Praetner M, Rehberg M, Fabritius M, Hessaauer M, Holzer M, Khandoga A, Fürst R, et al. (2014): Tissue Plasminogen Activator Promotes Postischemic Neutrophil Recruitment via Its Proteolytic and Nonproteolytic Properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 1495–1504

- van Lookeren Campagne M, Thibodeaux H, van Bruggen N, Cairns B, Gerlai R, Palmer JT, Williams SP, Lowe DG (1999): Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12870–12875
- Vasto S, Candore G, Listì F, Balistreri CR, Colonna-Romano G, Malavolta M, Lio D, Nuzzo D, Mocchegiani E, Di Bona D, Caruso C (2008): Inflammation, genes and zinc in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 58, 96–105
- Wakida K, Shimazawa M, Hozumi I, Satoh M, Nagase H, Inuzuka T, Hara H (2007): Neuroprotective effect of erythropoietin, and role of metallothionein-1 and -2, in permanent focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 148, 105–114
- Wesselkamper SC, McDowell SA, Medvedovic M, Dalton TP, Deshmukh HS, Sartor MA, Case LM, Henning LN, Borchers MT, Tomlinson CR, et al. (2006): The Role of Metallothionein in the Pathogenesis of Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34, 73–82
- West AK, Leung JYK, Chung RS (2011): Neuroprotection and regeneration by extracellular metallothionein via lipoprotein-receptor-related proteins. *J Biol Inorg Chem* 16, 1115–1122
- Won J, Khan ZA, Hong Y (2023): Effects of isoflurane and xylazine on inducing cerebral ischemia by the model of middle cerebral artery occlusion in mice. *Lab Anim Res* 39, 11
- Won S, Lee J-K, Stein DG (2015): Recombinant tissue plasminogen activator promotes, and progesterone attenuates, microglia/macrophage M1 polarization and recruitment of microglia after MCAO stroke in rats. *Brain Behav Immun* 49, 267–279
- Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Haile WB, Catano M, An J, Lee AK, Duong D, Dammer EB, et al. (2012): Tissue-Type Plasminogen Activator Regulates the Neuronal Uptake of Glucose in the Ischemic Brain. *J Neurosci* 32, 9848–9858
- Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS, Catano M, Yepes M (2013): Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK 1/2–CREB–ATF3 signaling pathway. *Mol Cell Neurosci* 52, 9–19
- Yamamoto Y (2017): Plasma marker of tissue oxidative damage and edaravone as a scavenger drug against peroxyl radicals and peroxynitrite. *J Clin Biochem Nutr* 60, 49–54
- Yang X, Doser TA, Fang CX, Nunn JM, Janardhanan R, Zhu M, Sreejayan N, Quirin MT, Ren J, Yang X, et al. (2006): Metallothionein prolongs survival and antagonizes senescence-associated cardiomyocyte diastolic dysfunction: role of oxidative stress. *FASEB J* 20, 1024–1026
- Yepes M (2015): Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the central nervous system. *Front Cell Neurosci* 9, 304
- Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA (2003): Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest* 112, 1533–1540

- Yin X, Knecht DA, Lynes MA (2005): Metallothionein mediates leukocyte chemotaxis. *BMC Immunol* 6, 21
- Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R (2002): Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. *Brain Res Brain Res Protoc* 9, 112–121
- Zausinger S, Schöller K, Plesnila N, Schmid-Elsaesser R (2003): Combination Drug Therapy and Mild Hypothermia After Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke* 34, 2246–2251
- Zhang C, An J, Haile WB, Echeverry R, Strickland DK, Yepes M (2009a): Microglial Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Mediates the Effect of Tissue-Type Plasminogen Activator on Matrix Metalloproteinase-9 Activity in the Ischemic Brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 1946–1954
- Zhang C, An J, Strickland DK, Yepes M (2009b): The Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Mediates Tissue-Type Plasminogen Activator-Induced Microglial Activation in the Ischemic Brain. *Am J Pathol* 174, 586–594
- Zhou H, Huang S, Sunnassee G, Guo W, Chen J, Guo Y, Tan S (2017): Neuroprotective effects of adjunctive treatments for acute stroke thrombolysis: a review of clinical evidence. *Int J Neurosci* 127, 1036–1046

Danksagung

Der größte Dank geht an Prof. Dr. Trendelenburg für die Möglichkeit, die Idee und die Unterstützung.

Außerdem danke ich Fr. Dr. B. Czech-Zechmeister und Fr. B. Könnecke für die labortechnischen Unterweisungen und Hilfestellungen. Ich möchte mich explizit bei allen Angehörigen unserer Arbeitsgruppe bedanken, insbesondere bei meinen Mitdotorandinnen Fr. Dr. L. Andresen, Fr. Dr. L. Krey und Fr. Dr. K. Schröder.

Außerdem bedanke ich mich bei der Klinik für Neurologie, in persona Prof. Dr. Bähr, für das Ermöglichen des Projekts.

Ich danke Hrn. Dr. Eidizadeh für die geleistete Vorarbeit und Zusammenarbeit insbesondere in Hinblick auf die gemeinsame Publikation.