

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

**Therapeutisches Potenzial und Langzeiteffekt
der TLR4-Inhibition bei der fokalen zerebralen Ischämie**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Lena Andresen

aus

Kiel

Göttingen 2015

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. med. G. Trendelenburg
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. rer. nat. T. A. Bayer
Drittreferent/in:	Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 11.05.2016

Hiermit erkläre ich, Lena Andresen, die Dissertation mit dem Titel "Therapeutisches Potenzial und Langzeiteffekt der TLR4-Inhibition bei der fokalen zerebralen Ischämie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 11.04.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Zerebrale Ischämie - Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.2 Pathophysiologie des Schlaganfalls.....	1
1.2.1 Exzitotoxizität.....	3
1.2.2 Apoptose und Nekroptose	4
1.2.3 Inflammation.....	5
1.2.4 Reaktive Astrozytose.....	8
1.3 Klinik des Schlaganfalls	9
1.4 Akuttherapie des Schlaganfalls	10
1.5 Ischämischer Schlaganfall im Tiermodell.....	11
1.5.1 Modelle globaler Ischämie	11
1.5.2 Modelle fokaler Ischämie	11
1.6 Toll-ähnliche Rezeptoren.....	14
1.6.1 Familie der Toll-ähnlichen Rezeptoren.....	14
1.6.2 TLR4-Rezeptoren und ihre Funktion in der postischämischen Inflammation.....	16
1.6.3 Aktueller Stand der Forschung: TLR4-Inhibitoren als möglicher Therapieansatz	17
2 Fragestellung und Zielsetzung	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Material und Geräte	20
3.2 Methoden.....	25
3.2.1 Middle cerebral artery occlusion	25
3.2.2 Intraarterielle Applikation	27
3.2.3 Postoperative Versorgung.....	28
3.2.4 Haltung der Tiere	29
3.2.5 Ausschlusskriterien.....	29
3.2.6 Randomisierung und Verblindung.....	30
3.2.7 Neurologisches Scoring.....	30
3.2.8 Präparation der Gewebe.....	32
3.2.9 Infarktmetrie.....	33
3.2.10 Immunhistochemie	35
3.2.11 Digitalisierung der Schnitte.....	37
3.2.12 Zellzählung	37

3.2.13	Statistische Auswertung.....	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Kurzzeitversuch.....	39
4.1.1	Physiologische Parameter.....	39
4.1.2	Neuroscore.....	41
4.1.3	Mortalität.....	42
4.1.4	Infarktgrößen.....	43
4.1.5	Gruppengrößenberechnung.....	46
4.2	Untersuchung der postischämischen Mortalität.....	46
4.2.1	Okklusionszeit und postoperative Käfigtemperatur.....	47
4.2.2	Intensivierte postoperative Versorgung.....	49
4.2.3	Erfahrung des Operateurs.....	52
4.3	Langzeitversuch.....	53
4.3.1	Physiologische Parameter.....	55
4.3.2	Neuroscore.....	57
4.3.3	Mortalität.....	60
4.3.4	Infarktgrößen.....	61
4.3.5	Immunhistochemie.....	62
5	Diskussion.....	74
5.1	Neuroprotektive Wirkung der TLR4-Inhibition.....	74
5.2	Mortalität als Komplikation des Schlaganfalls.....	78
5.2.1	Verschiedene Parameter und ihr Einfluss auf die Mortalität.....	79
5.2.2	Der Einfluss postischämischer Infektionen auf die Mortalitätsrate.....	80
5.2.3	Präventive Antibiotikagabe zur Senkung postischämischer Infektionen.....	80
5.3	Methodendiskussion.....	82
5.3.1	Methoden zur Untersuchung des therapeutischen Effekts.....	83
5.3.2	Etablierung einer neuen Okklusionszeit für Langzeitversuche.....	86
5.3.3	Reperfusionzeitraum: eine Annäherung an die Klinik.....	86
5.4	Schlussfolgerung: Relevanz der Ergebnisse.....	87
6	Zusammenfassung.....	88
7	Anhang.....	89
7.1	Bestätigung der fachlichen Eignung.....	89
7.2	Zertifikat über den FELASA-B-Kurs.....	90
7.3	Protokoll für die Herstellung von Citratpuffer.....	91
7.4	Protokoll für die Herstellung von TBS (1 l).....	92
7.5	Protokoll für die Herstellung von PBS (1 l).....	92
7.6	Berechnung der Moxifloxacinmenge.....	92
8	Literaturverzeichnis.....	93
8.1	Internetquellen.....	105
8.2	Bildquellen.....	105

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologie der <i>Penumbra</i> im zeitlichen Verlauf.....	3
Abbildung 2: Neurodestruktive und -protektive Aspekte der Inflammation	7
Abbildung 3: Arterielle Blutversorgung des Gehirns.....	12
Abbildung 4: Humane TLR-Rezeptoren und ihre Signalwege.....	15
Abbildung 5: Durchführung der MCAO mit intraarterieller Applikation.....	26
Abbildung 6: Zellquantifizierung in prädefinierten Auswertungs-Zonen in Form von Kästen.....	37
Abbildung 7: Gewicht- und Temperaturwerte im Kurzzeitversuch	41
Abbildung 8: Neuroscores im Kurzzeitversuch	42
Abbildung 9: Überleben im Kurzzeitversuch	43
Abbildung 10: Infarktvolumentrie im Kurzzeitversuch	44
Abbildung 11: TTC-Färbung.....	45
Abbildung 12: Mortalitätsvergleich TLR4-Ak vs PBS bei 30-minütiger MCAO und 7-tägiger Reperfusion.....	47
Abbildung 13: Pilotversuch mit veränderter Okklusionsdauer und modifizierter postoperativer Käfigtemperatur	48
Abbildung 14: Pilotversuch mit intensivierter postoperativer Versorgung.....	51
Abbildung 15: Pilotversuch zum Einfluss der Erfahrung des Operateurs auf das Überleben	52
Abbildung 16: Versuchsablauf des Langzeitversuchs.....	54
Abbildung 17: Gewicht und Temperatur im Langzeitversuch.....	56
Abbildung 18: Neuroscores im Langzeitversuch	59
Abbildung 19: Überleben im Langzeitversuch	60
Abbildung 20: Infarktvolumentrie in Fluoro-Jade-C-gefärbten Gehirnschnitten	61
Abbildung 21: Direktes Infarktvolumen im Langzeitversuch.....	62
Abbildung 22: TLR4-Expression	63
Abbildung 23: TLR4-Kolokalisation	64
Abbildung 24: Zellquantifizierung.....	65
Abbildung 25: Immunhistochemische Darstellung von NeuN-positiven Zellen im Langzeitversuch	67
Abbildung 26: Neuronales Überleben im Langzeitversuch.....	68
Abbildung 27: Immunhistochemische Darstellung von Iba1-positiven Zellen im Langzeitversuch.....	70
Abbildung 28: Makrophagen und Mikroglia im Langzeitversuch	71
Abbildung 29: Immunhistochemische Darstellung von GFAP-positiven Zellen im Langzeitversuch.....	72
Abbildung 30: Astrozyten im Langzeitversuch	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: wichtige verwendete Geräte und Softwareprogramme.....	20
Tabelle 2: verwendetes chirurgisches Material.....	21
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien und Reagenzien.....	22
Tabelle 4: Tierarten und Züchter.....	24
Tabelle 5: verwendete Antikörper.....	24
Tabelle 6: Bederson-Score.....	31
Tabelle 7: modified Neurological Score Scale.....	31
Tabelle 8: Ergebnisse der Neuroscores im Langzeitversuch.....	58

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
A.	<i>Arteria</i>
Aa.	<i>Arteriae</i>
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
Cy	Cyanin
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
et al.	<i>et alii</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GLT	Glutamatttransporter
Iba	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule</i>
IFN	Interferon
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MCAO	<i>Middle cerebral artery occlusion</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mNSS	<i>modified Neurological Score Scale</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MyD	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NeuN	<i>Neuron-specific nuclear antigen</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NIHSS	<i>National Institute of Health Stroke Scale</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
p-Wert	Signifikanzwert
RCCA	rechte <i>Arteria carotis communis</i>
RECA	rechte <i>Arteria carotis externa</i>

RICA	rechte <i>Arteria carotis interna</i>
RMCA	rechte <i>Arteria cerebri media</i>
rtPA	<i>Recombinant tissue plasminogen activator</i>
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SIDS	<i>Stroke-induced immunodepression syndrome</i>
SISA	<i>Simple Interactive Statistical Analysis</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TIR	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-β</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
ZNS	Zentrales Nervensystem
α	alpha
β	beta

1 Einleitung

1.1 Zerebrale Ischämie - Epidemiologie und Ätiologie

Der Schlaganfall ist nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache der Welt und mit ca. 262 000 Fällen pro Jahr die dritthäufigste Todesursache in Deutschland (Heuschmann *et alii* (et al.) 2010). Außerdem zählt er als die häufigste Ursache für erworbene Behinderungen (Heuschmann et al. 2010).

Laut Definition wird dann von einem Schlaganfall gesprochen, wenn sich klinische Anzeichen einer fokalen oder globalen zerebralen Störung schnell entwickeln, von vaskulärer Genese sind und die Symptome mehr als 24 h andauern oder zum Tod führen (Hatano 1976). Es wird zwischen hämorrhagischen (Gehirnblutung) und ischämischen Ursachen (Mangeldurchblutung) unterschieden (Donnan et al. 2008), wobei letztere 87 % der Fälle ausmachen (Mozaffarian et al. 2015).

In meiner Doktorarbeit beschäftige ich mich ausschließlich mit dem Schlaganfall ischämischer Genese, der auch gern als ischämischer "Hirnsult" oder "Hirnschlag" bezeichnet wird (Leitlinie ischämischer Schlaganfall 2012). Die Durchblutungsstörung, die zum akuten fokalen neurologischen Defizit führt, ist in den meisten Fällen bedingt durch lokal entstandene Blutgerinnsel (*Thrombus*) aufgrund von arteriosklerotischen Gefäßumbauten oder wird von aus dem Herzen eingeschwemmten Gerinnsel (*Embolus*) verursacht (Grau et al. 2001). Man unterscheidet zwischen Makroangiopathien, in denen große Gefäße pathologisch verändert sind, und Mikroangiopathien, bei denen kleinere Gefäße betroffen sind. Seltener Ursachen für Stenosen und Gefäßverschlüsse sind u.a. Vaskulitiden, Dissektionen sowie Gerinnungsstörungen (Adams et al. 1993; Grau et al. 2001; Mumenthaler und Mattle 2008, Leitlinie ischämischer Schlaganfall 2012).

1.2 Pathophysiologie des Schlaganfalls

Da die Glykogenspeicherkapazität des Gehirns sehr klein ist, deckt es seinen Energiebedarf vor allem über ATP (Adenosintriphosphat) aus oxidativer Phosphorylierung (Dirnagl et al. 1999). Hierfür ist es auf eine kontinuierliche Glukosezufuhr aus dem peripheren Blut angewiesen (Iadecola und Anrather 2011). Ein großer Anteil der Energie wird dafür benötigt, über ATP-abhängige Ionenpumpen die Membranpotenziale der einzelnen Zelltypen aufrecht zu erhalten (Iadecola und Anrather 2011). Eine Mangeldurchblutung im

Rahmen eines Schlaganfalls führt zu einer Minderversorgung an Sauerstoff und Glukose in den betroffenen Gehirnarealen (Dirnagl et al. 1999). Es entsteht ein Energiemangelzustand, aus dem eine neuronale Zellschädigung resultiert (Dirnagl et al. 1999; Lipton 1999).

Grundsätzlich wird in der Pathogenese bzw. -physiologie des Schlaganfalls zwischen zwei verschiedenen Gehirnarealen unterschieden, die in unterschiedlichem Ausmaß und zeitlichem Verlauf Schaden nehmen.

In der *Core Region*, dem Infarktzentrum, das unmittelbar von der Blutzufuhr abgeschieden ist, ist die verbleibende Perfusion mit Werten von weniger als 10 ml/ 100 g Gehirngewebe/ Minute zu niedrig, um den Energiebedarf der Zellen zu decken (Symon et al. 1979). Es fehlt ATP, um die physiologischen Ionengradienten der Zellen aufrechtzuerhalten, ihre Ruhemembranpotenziale werden instabil (Hansen 1985). Es folgen anoxische Depolarisationen, die mit einem massiven Natrium- und Calciumeinstrom einhergehen (Silver und Erecińska 1990). Durch osmotischen Ausgleich in Form von Wassereinstrom kommt es zur Schwellung und Degeneration von Zellorganellen, die Zellmembranen werden durchlässig und die Zellen nekrotisch (Lipton 1999; Iadecola und Anrather 2011). Diese Prozesse spielen sich innerhalb weniger Minuten nach Eintritt der Minderperfusion ab (Iadecola und Anrather 2011).

In den Randgebieten des Infarktkerns ist allerdings noch so viel Blutfluss vorhanden, dass die Zellen zunächst intakt bleiben und trotz der geringen Sauerstoffzufuhr eine nahezu normale ATP-Konzentration aufweisen (Astrup et al. 1981). Veränderungen in den Konzentrationen von Energiemetaboliten wie Phosphokreatin, Laktat, Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) führen dennoch zu einem Energiedefizit, das sich in repetitiven Depolarisationen äußert (Lowry et al. 1964; Salford et al. 1973a; Salford et al. 1973b; Astrup et al. 1977; Astrup et al. 1981). Aufgrund ihrer Lokalisation bezeichnet man sie als Periinfarktdepolarisationen. Da sich diese Periinfarktregion ringförmig um den Infarktkern legt und somit dem Bild einer totalen Sonnenfinsternis ähnelt, spricht man auch von der *Penumbra* (lateinisch: Halbschatten) des Infarkts (Astrup et al. 1981). Da irreversible Schädigungen hier erst im weiteren zeitlichen Verlauf durch Entzündungsprozesse und programmierten Zelltod entstehen (siehe (s.) Abbildung 1), handelt es sich bei der *Penumbra* um potenziell zu rettendes Gewebe und somit um einen Ansatzpunkt für Therapiestrategien (Astrup et al. 1981; Fisher und Garcia 1996; Donnan et al. 2008).

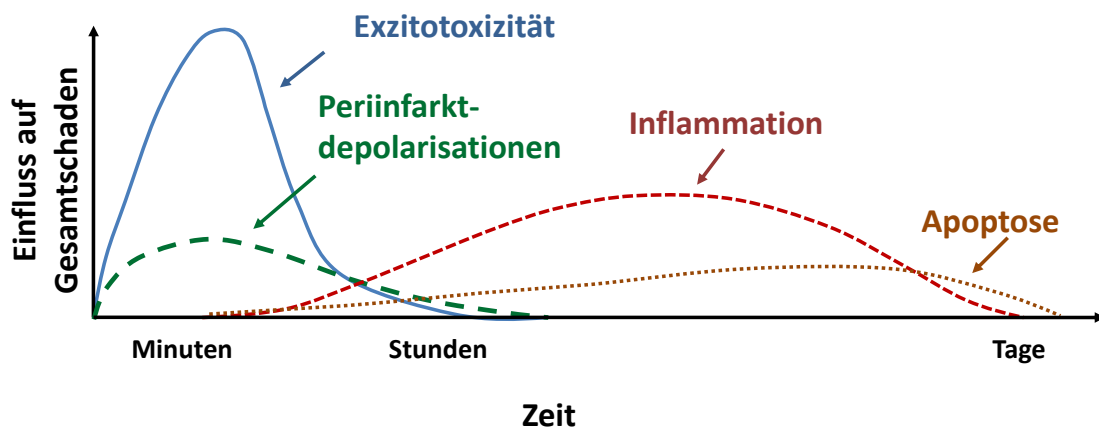


Abbildung 1: Pathophysiologie der *Penumbra* im zeitlichen Verlauf

Diese Abbildung entspricht einer ins Deutsche übersetzten Abbildung von Dirnagl et al. (1999), in der die Grafen farbig hinterlegt wurden. In Rücksprache mit dem Verlag darf die Abbildung in dieser Form hier verwendet werden.

1.2.1 Exzitotoxizität

Das Phänomen der Exzitotoxizität spielt sich sowohl im Infarkt kern als auch in der *Penumbra* ab: Durch die Depolarisation von Neuronen werden präsynaptisch sowie somatodendritisch spannungsabhängige Calcium-Kanäle aktiviert (Hansen 1985). Auf den Calciumeinstrom folgt die Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren wie Glutamat (Benveniste et al. 1984). Dieses akkumuliert im Extrazellulärraum, sammelt sich im präsynaptischen Spalt an und bindet u.a. an *N-methyl-D-aspartate*-Kanäle (NMDA-Kanäle), die durch ihre Kopplung an Calcium-Kanäle einen weiteren Calciumeinstrom begünstigen (MacDermott et al. 1986; Silver und Erecińska 1990). Des Weiteren strömen über Glutamat-aktivierte *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid*-Rezeptoren (AMPA-Rezeptoren) Natrium- und Chloridionen ins Zellinnere (Dirnagl et al. 1999). Ihnen folgt ein passiver Wassereinstrom, der zur Zellschwellung führt und mit der Zeit durch extrazelluläre Ödembildung den intrakraniellen Druck erhöht (Katayama et al. 1992). Je nach Ausmaß kann dieser Prozess durch Gefäßkompressionen oder *Herniationen* (Gehirneinklemmungen) tödlichen Ausgang nehmen (Dirnagl et al. 1999). Das Gehirnödem ist somit einer der entscheidenden Parameter, ob ein Patient die ersten Stunden und Tage nach Schlaganfall überlebt oder nicht (Dirnagl et al. 1999).

Neben der Entwicklung eines Gehirnödems fördert der massive Calciumeinstrom weitere zelldestruktive Mechanismen.

In seiner Funktion als *Second messenger* aktiviert Calcium proteolytische Enzyme, die Bestandteile des Zytoskeletts sowie Proteine der extrazellulären Matrix zerstören (Orrenius et al. 1992; Neely und Gesemann 1994). Die Aktivierung der Phospholipase A2 sowie der Cyclooxygenase führt zur Produktion freier Sauerstoffradikale, die über verschiedene Wege weiteres Gewebe schädigen (Orrenius et al. 1992; Iadecola et al. 2001). Einer dieser Wege ist der des apoptotischen Zelluntergangs.

1.2.2 Apoptose und Nekroptose

Oxidativer Stress in Form von freien Sauerstoffradikalen ist nur einer von vielen Auslösern der Apoptose. Er verursacht DNA-Schäden, die zum Zellzyklusarrest führen, sowie Schäden an der inneren Mitochondrienmembran und triggert dadurch die Freisetzung von Cytochrom C (Fujimura et al. 1998; Dirnagl et al. 1999). Beides aktiviert die intrinsische apoptotische Signalkaskade (Linnik et al. 1995; Leist und Nicotera 1998). Die extrinsische Signalkaskade steht im Zusammenhang mit einer Stimulation des FAS-Rezeptors (He et al. 2009). Diese erfolgt durch den FAS-Liganden oder Zytokine wie den Tumornekrosefaktor α (TNF α) (Iadecola und Anrather 2011). Da diese in Reaktion auf oxidativen Stress vermehrt freigesetzt werden (s. Kapitel 1.2.3), kann auch die Aktivierung der extrinsischen Signalkaskade auf eine Ansammlung reaktiver Sauerstoffspezies zurückgeführt werden.

Beide Signalwege aktivieren eine Reihe an Caspasen, die durch ihre proteolytische Aktivität entweder eigenständig oder durch die Aktivierung von Desoxyribonukleasen und anderen Enzymen zelleigene Proteine spalten und somit kontrolliert den Zellabbau herbeiführen (Dirnagl et al. 1999).

Wird die apoptotische Signaltransduktion durch eine Inhibition bestimmter Caspasen (z.B. Caspase 8) unterbunden, setzt stattdessen ein Nekrose-ähnlicher Zelluntergang, auch Nekroptose genannt, ein (Degterev et al. 2005). Diese kann entweder TNF α - oder *Toll-like receptor* (TLR)3- bzw. TLR4-abhängig induziert werden (Degterev et al. 2005; He et al. 2009; He et al. 2011). Im Gegensatz zur Nekrose spielt sich der programmierte Zelltod vor allem in den Zellen ab, deren Energieressourcen noch ausreichen, um den Zelluntergang so weit zu kontrollieren, dass er nicht in einer überschießenden Entzündungsreaktion endet (Leist und Nicotera 1998). Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, befinden sich diese Zellen größtenteils in der *Penumbra* des Infarkts.

1.2.3 Inflammation

Ein anderer Mechanismus, der zur Ausdehnung des Gewebeschadens auf die *Penumbra* beiträgt und somit Einfluss auf die klinische Symptomatik des Patienten hat, ist die postischämische Entzündungsreaktion. Diese geht zunächst von residenten Immunzellen aus, weitet sich aber im weiteren Verlauf auch auf Zellen des peripheren Immunsystems aus (Gelderblom et al. 2009). Dies erklärt sich vor allem dadurch, dass die Blut-Hirn-Schranke, die im gesunden Gehirn die Immunzellen von Blut und Zentralem Nervensystem (ZNS) weitestgehend voneinander trennt, infolge des Hirninsults durchlässig wird und eine Migration von Entzündungszellen aus dem Blut ins Gehirn ermöglicht (Grønberg et al. 2013).

Trotz der zerebralen postischämischen Immunantwort ist die Infektrate bei Patienten nach Schlaganfall deutlich erhöht und zählt zu den Hauptursachen für postischämische Mortalität (Dirnagl et al. 2007). Dies lässt sich durch das Phänomen des *CNS injury-induced immune deficiency syndrome* (CIDS) oder auch *Stroke-induced immunodepression syndrome* (SIDS) erklären (Meisel et al. 2005; Dirnagl et al. 2007). Zentrale Sensoren der Immunregulation werden durch die massive Freisetzung von Entzündungsmediatoren stimuliert (Dirnagl et al. 2007). Sie können nicht zwischen zentraler und peripherer Herkunft differenzieren. Somit wird aus ihrem eigentlichen Bestreben, eine Homöostase zwischen peripherer und zentraler Immunaktivität herzustellen, eine systemische Immundepression, da sie sympatho-adrenerg vermittelt die normale Aktivität des peripheren Immunsystems herabsetzen (Dirnagl et al. 2007). Die Entstehung von lebensbedrohlichen Infektionen wie Pneumonien wird hierdurch begünstigt (Prass et al. 2003; Meisel et al. 2005).

Es ist also aus verschiedenen Gründen wichtig, die genauen Abläufe der postischämischen Inflammation zu verstehen und aus ihnen Ansätze für Therapieoptionen zu entwickeln.

Durch die Beteiligung verschiedener Entzündungszellen und das Zusammenspiel angeborener und erworbener Immunantworten wird ebenso wie bei anderen Organen zwischen einer akuten und einer postakuten Immunreaktion unterschieden.

Angestoßen wird der Entzündungsprozess durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies sowie *Damage associated molecular patterns* (DAMPs) als Zellbestandteile nekrotischer Zellen (Iadecola und Anrather 2011).

Beide induzieren über Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, *Hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1), *Interferon regulatory factor 3* (IRF-3) und *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) eine vermehrte Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren (Planas et al.

1996; O'Neill und Kaltschmidt 1997; Ruscher et al. 1998; Iadecola et al. 1999). Hierzu gehören $\text{TNF}\alpha$, das Interleukin 1β (IL- 1β) sowie die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9). Diese aktivieren ihrerseits weitere residente Immunzellen wie Mikroglia und rekrutieren Immunzellen aus dem Blut in Ergänzung zu den vermehrt exprimierten Zelladhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Leukozyten (s. Abbildung 2) (Wang et al. 1994; zitiert nach Dirnagl et al. 1999; Shichita et al. 2012).

Die gesteigerte Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt zusätzlich zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, zu einer Verstärkung des Gehirnödems und des neuronalen Zelltods sowie gelegentlich zu hämorrhagischen Transformationen (s. Abbildung 2) (Yamasaki et al. 1995; Asahi et al. 2001; Jin et al. 2010). Der Schaden im Gehirngewebe nimmt zu.

Im temporalen Profil handelt es sich bei den eingewanderten Zellen zunächst um Neutrophile, es folgen Makrophagen und Monozyten sowie mit etwas zeitlichem Abstand T-Zellen als Repräsentanten der angeborenen Immunabwehr (Gelderblom et al. 2009).

Residente Mikroglia und aus dem Blut eingewanderte Makrophagen und Monozyten unterscheiden sich vor allem in ihrer zeitlichen Aktivität (Jin et al. 2010). Mikroglia sind bereits wenige Stunden nach Ischämie aktiv, während Makrophagen und Monozyten erst mit einer zeitlichen Verzögerung von drei bis sieben Tagen nach Ischämie ins Gehirn einwandern (zitiert nach Jin et al. 2010). In ihrer Funktion und Morphologie sind Mikroglia und Makrophagen nur schwer zu unterscheiden (Schilling et al. 2003; Schilling et al. 2005). In der Akutphase der Entzündung, die sich vor allem in den ersten 72 Stunden nach dem Schlaganfall abspielt (Bohacek et al. 2012), steigern sie die Immunreaktion über die Produktion weiterer Sauerstoffradikale, Zytokine und Matrix-Metalloproteinase-9 (Jin et al. 2010).

Durch ihre phagozytotische Aktivität weisen Mikroglia und Makrophagen auch neuroprotektive Funktionen auf, da sie im weiteren Entzündungsprozess an der Eliminierung von eingewanderten Neutrophilen beteiligt sind (Denes et al. 2007). Auch produzieren sie neurotrophische Wachstumsfaktoren wie den *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1), *Transforming growth factor $\beta 1$* (TGF- $\beta 1$) oder den *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Kiefer et al. 1993; Nakajima et al. 2001; Morgan et al. 2004; Choi et al. 2008).

Neutrophile sind bereits zwölf Stunden nach Ischämie in den betroffenen Gehirnarealen anzutreffen und erreichen typischerweise bis zum dritten Reperfusionstag ihre größte Infiltrationsdichte (Gelderblom et al. 2009; Grønberg et al. 2013). Als Vertreter der unspezifischen Immunreaktion steigern sie den Entzündungsprozess ähnlich wie Mikroglia

und Makrophagen durch die Freisetzung freier Sauerstoffradikale, Zyto- und Chemokine, Matrix-Metalloproteinase-9 sowie Elastase (Jin et al. 2010). Auch fördern sie die Expression von Integrinen und Zelladhäsionsmolekülen und somit weitere Zellmigration aus dem Blut (s. Abbildung 2) (Dirnagl et al. 1999; Forster et al. 1999; Jin et al. 2010).

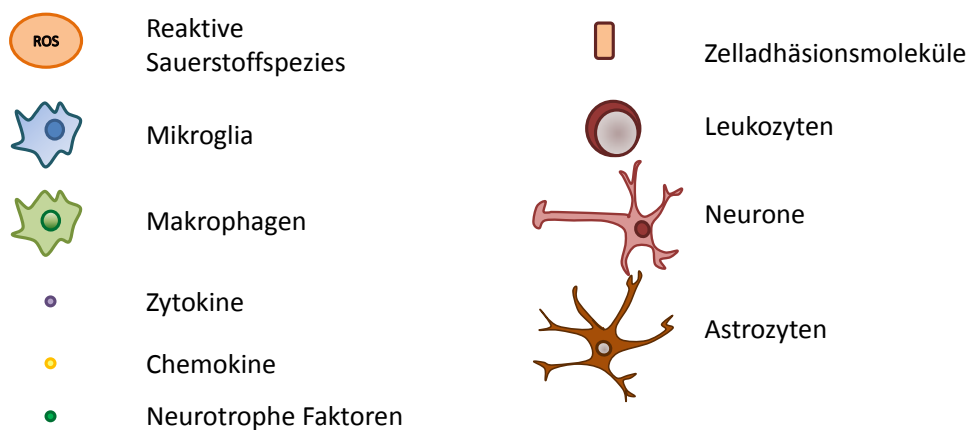
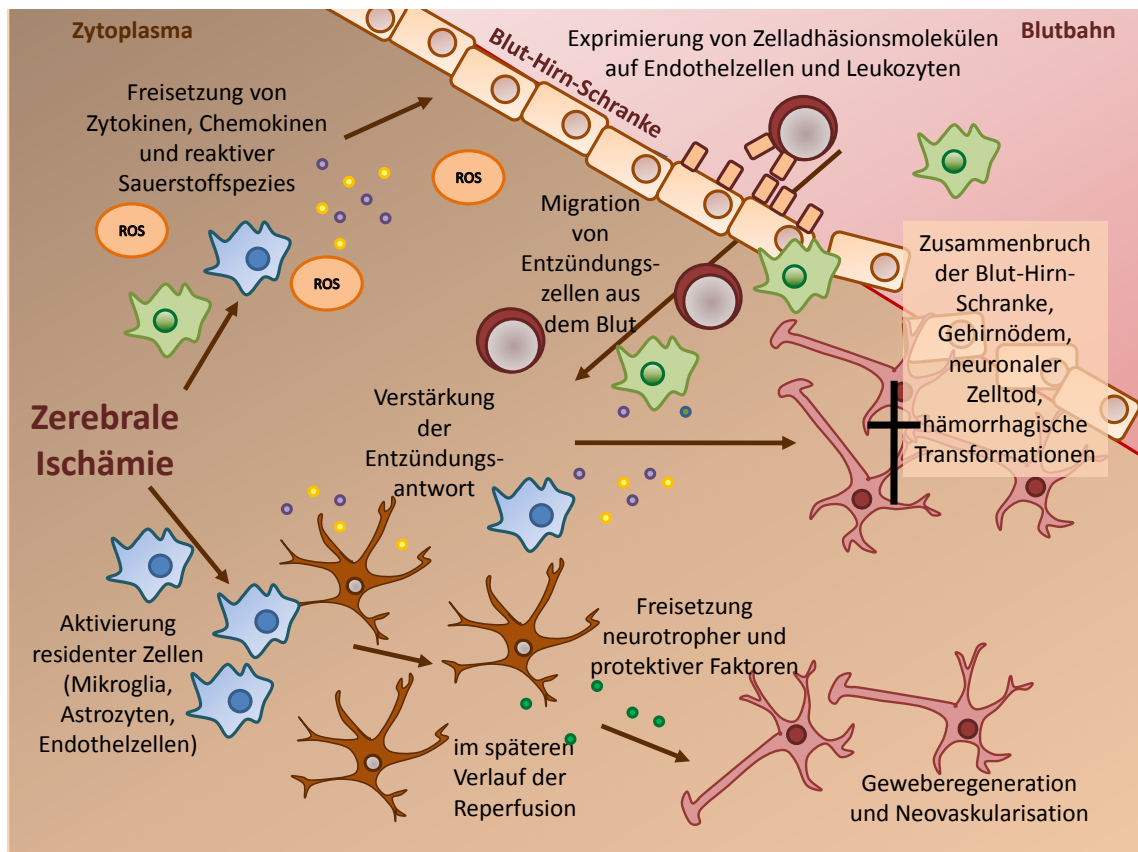


Abbildung 2: Neurodestruktive und -protektive Aspekte der Inflammation

Die Abbildung dient der vereinfachten Veranschaulichung der neurodestruktiven und neuroprotektiven postischämischen Mechanismen und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Ab dem dritten Tag nach der Ischämie setzt mit der Einwanderung von T-Zellen aus dem Blut die spezifische Immunabwehr ein (Gelderblom et al. 2009). In dieser postakuten Phase der Entzündung stehen pro- und antiinflammatorische T-Zellen im Wechselspiel (s. Abbildung 2). Welche Rolle die einzelnen T-Zell-Subtypen in diesem Prozess einnehmen, ist im Detail bis heute nicht eindeutig geklärt (Jin et al. 2010).

Klar ist allerdings, dass der gesamte inflammatorische Prozess nicht nur mit neurologischem Schaden assoziiert werden darf, sondern in einzelnen Bereichen essenziell für die Regeneration des Gehirngewebes nach einem ischämischen Insult ist (Dirnagl et al. 1999) (s. Abbildung 2). Dies erschwert die Entwicklung antiinflammatorischer Therapieansätze zur Erhaltung der *Penumbra*.

1.2.4 Reaktive Astrozytose

Astrozyten machen als größte nicht-neuronale Zellgruppe mehr als 50 % des Gehirnvolumens aus und sind als Teil der residenten Glia im gesunden Gehirn unerlässlich für die Aufrechterhaltung der neuronalen Zellfunktion (Chen und Swanson 2003). Sie regulieren u.a. die synaptische Aktivität über die Aufnahme bzw. Abgabe von Neurotransmittern wie Glutamat oder γ -Aminobuttersäure (GABA) (Schousboe et al. 2004). Astrozyten können keine Aktionspotenziale entwickeln und, da sie über *Gap Junctions* untereinander in einem großen Astrogliaznetzwerk verbunden sind, weisen sie eine hervorragende Pufferfunktion in Bezug auf den extrazellulären Kalium- und Wasserstoff-Haushalt auf (Kuffler et al. 1966; Karwoski et al. 1989; Deitmer und Rose 1996; Cotrina et al. 1998). Auch der Wasserhaushalt des Gehirns wird im großen Maßstab über dieses Netzwerk reguliert (Venero et al. 2001).

Die Astroglia ist auch an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Trendelenburg und Dirnagl 2005). Durch ihre Fähigkeit, mit ihren Zellausläufern Kontakt zur Blutversorgung herzustellen und in geringen Maßen Glykogen zu speichern, ist sie essentiell für die neuronale Energiezufuhr (Dringen et al. 1993; Trendelenburg und Dirnagl 2005).

Infolge eines ischämischen Insults nehmen Astrozyten sowohl in neurodestruktiver als auch -protektiver Form am postischämischen Geschehen teil. Eine Unterscheidung zwischen "Gutem" und "Bösem" ist nicht immer eindeutig zu treffen und hängt, wie auch bei anderen Zelltypen, vom Ausmaß des Schadens, Kofaktoren und zeitlichen Komponenten ab (Trendelenburg und Dirnagl 2005).

Bekannt ist, dass die Perizyten reaktiver Astrozyten im Rahmen der sog. *Astrogliose* eine Glianarbe ausbilden, um geschädigtes Gewebe von gesundem zu trennen (Chen und Swanson 2003). Dadurch, dass sie exzitatorische Aminosäuren, Ionen und reaktive Sauerstoffspezies puffern können, reduzieren sie sekundären neuronalen Zelltod im umliegenden Gewebe (Chen et al. 2001; Cui et al. 2001; Rolls et al. 2009). Zusätzlich versorgen und stimulieren sie intakte Neurone am Rand der Läsion mit Glukose und Wachstumsfaktoren wie dem *Insulin-like growth factor*, *Nerve growth factor* oder *Brain-derived neurotrophic factor* (Wu et al. 1998; Rolls et al. 2009). Im Zentrum der Läsion induzieren sie fibrotische Gewebeneubildung und Neovaskularisation (Rolls et al. 2009).

Da die Glianarbe zu späteren Zeitpunkten axonales Wachstum inhibiert und somit neuronale Regeneration im Bereich der Läsion erschwert, gilt sie im Zusammenhang mit dem langfristigen Regenerationsprozess als hinderlich (McKeon et al. 1999; Rolls et al. 2009; Huang et al. 2014).

1.3 Klinik des Schlaganfalls

Die Klinik des ischämischen Schlaganfalls ist sehr vielfältig und abhängig vom Ausmaß und der Lokalisation des betroffenen Areals. Auf Läsionen des Medialstromgebietes, auf denen der Schwerpunkt meiner Arbeit liegt, folgen beim Menschen u.a. auf der Gegenseite der betroffenen Gehirnhälfte lokalisierte Halbseitenschwächen von Gesicht, Arm und/oder Bein (*kontralaterale faziobrachiokrurale Hemiparesen*), Halbseitenlähmungen (*Hemiplegien*), Taubheitsgefühle (*hemisensible Defizite*) und Sehstörungen (*homonyme Gesichtsfeldausfälle und Blickparesen zur kontralateralen Seite*) (Mumenthaler und Mattle 2008).

Zusätzlich können Sprachstörungen (*Aphasien*) und Störungen in zielgerichteten, willkürlichen Bewegungen (*Apraxien*) auftreten sowie das Unvermögen, Teile der Umwelt wie z. B. eine Körperhälfte oder eine Raumseite wahrzunehmen (*hemispatale Neglekte*) (Mumenthaler und Mattle 2008).

Zur klinischen Beurteilung des Schweregrades eines Hirninfarkts werden diese Symptome in der modifizierten *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS) in ihrer Ausprägung beurteilt und über ein Punktesystem bewertet (Brott et al. 1989). Bei einer Punktzahl zwischen 1 - 15 geht man von einem mittelschweren Infarkt aus, ein Gesamtscore von 21 - 42 deutet auf einen sehr schweren Infarkt hin.

Die Prognose eines Hirninfarkts ist u.a. abhängig von seiner Schwere. Kleine Infarkte, bei denen nur Arteriolen betroffen sind (*lakunäre Infarkte*), weisen eine sehr geringe Mortalität

auf, während nach nicht-lakunären Infarkten, bei denen Äste größerer Gehirnarterien und demnach auch größere Gehirnareale betroffen sind, bereits nach einem Monat ca. 10 - 20 % und nach einem Jahr mehr als 20 % aller Patienten verstorben sind (Jackson und Sudlow 2005; Mumenthaler und Mattle 2008).

1.4 Akuttherapie des Schlaganfalls

Die Therapieempfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie für die akute Schlaganfallbehandlung setzen sich aus verschiedenen Bausteinen zusammen (Leitlinie ischämischer Schlaganfall 2012). Hierzu gehören die Überwachung des neurologischen Status wie der Vitalparameter, die ggf. über Blutdruck- und Blutzuckereinstellung, Elektrolytgabe und antipyretischer Therapie stabilisiert werden sollten, eine frühe Sekundärprophylaxe meist verbunden mit der Gabe von Aspirin (100 mg), die Vorbeugung und Behandlung von Komplikationen sowie die Einleitung früher rehabilitativer Maßnahmen (Leitlinie ischämischer Schlaganfall 2012).

Eine signifikante Verbesserung des klinischen Outcomes wird durch eine frühe rekanalisierende Therapie erreicht (Lees et al. 2010). Diese kann thrombolytisch durch die intravenöse Gabe von *Recombinant tissue plasminogen activator* (rtPA) innerhalb der ersten 4,5 Stunden der Ischämie erfolgen (Hacke et al. 2008; Lees et al. 2010). Intraarteriell kann eine Thrombolyse bis zu 6 Stunden nach Infarktbeginn durchgeführt werden (Mumenthaler und Mattle 2008).

Allerdings ist diese Therapie vor allem bei Patienten mit leichten und mittelschweren Infarkten (NIHSS-Skala von 6 - 15) untersucht. Bei Patienten mit sehr schweren Infarkten (NIHSS > 25) wird aufgrund der Gefahr von Sekundärblutungen nur im Individualfall eine Thrombolyse eingeleitet werden (Leitlinie ischämischer Schlaganfall 2012). Eine Kontraindikation stellen Patienten mit nicht einstellbarem Hypertonus (RR > 185/110 mmHg) dar (Leitlinie ischämischer Schlaganfall 2012). Auch ist eine Kombination aus intravenöser und intraarterieller Lyse möglich. Dieses Verfahren bezeichnet man als "Bridging" (Pfefferkorn et al. 2010).

Bei proximalen Gefäßverschlüssen ist die Rekanalisationsrate durch eine mechanische Thrombektomie höher (Leitlinie ischämischer Schlaganfall 2012). Verschiedene Studien konnten jüngst eine Verbesserung des funktionellen Outcomes und der Mortalität gegenüber alleiniger rtPA-induzierter Lyse zeigen (Berkhemer et al. 2015; Campbell et al. 2015; Goyal et al. 2015).

1.5 Ischämischer Schlaganfall im Tiermodell

Im Verhältnis zur hohen Inzidenz an Schlaganfällen sind die neuroprotektiven therapeutischen Möglichkeiten noch immer recht begrenzt. Aus diesem Grund beschäftigen sich inzwischen viele Neurowissenschaftler intensiv mit der Pathophysiologie des ischämischen Insults und den daraus resultierenden Therapiemöglichkeiten. Da die zerebrale Blutversorgung von Mäusen und Ratten in starker Analogie zu der des Menschen steht, wird die experimentelle Schlaganfallforschung vor allem an diesen Nagern durchgeführt (Rami et al. 2008). Um erfolgreiche Behandlungskonzepte der experimentellen Forschung auf die Klinik übertragen zu können, sollten die untersuchten Tiermodelle der Ätiologie, Pathogenese und -physiologie des Menschen möglichst nahekommen (Perel et al. 2007). Da diese wie in Kapitel 1.2 beschrieben sehr vielfältig sind, haben sich im Laufe der Zeit verschiedene Modelle für tierexperimentelle Schlaganfälle entwickelt. Unterschieden wird vor allem zwischen Modellen der globalen und fokalen, sowie der transienten und permanenten Ischämie.

1.5.1 Modelle globaler Ischämie

Die kardiale Genese der globalen Ischämie kann u.a. durch einen Herzstillstand infolge von intrakardialen Kaliumchloridinjektionen simuliert werden (Kofler et al. 2004). Auch wenn die Pathogenese dieser und anderer Modelle ähnlichen Ansatzes der des Menschen sehr nahekommt, erschweren große Varianzen der Ergebnisse die Vergleichbarkeit (Hossmann 2008).

Bei der Induktion einer kompletten oder inkompletten globalen Ischämie über eine selektive Unterbindung der zerebralen Blutzufuhr werden die Varianzen reduziert (Hossmann 2008). Allerdings ist eine klinische Interpretation der Ergebnisse nur bedingt möglich, da das zeitgleiche Koagulieren oder Stenosieren fast aller blutzuführenden zerebralen Gefäße den klinischen Vorgängen nicht sonderlich entspricht (Pulsinelli und Brierley 1979; Shibata et al. 2004; Hossmann 2008)

1.5.2 Modelle fokaler Ischämie

Die fokale Ischämie äußert sich meist in einer Minderperfusion der *A. cerebri media* (*Arteria cerebri media*) (Bogousslavsky et al. 1988). Die meisten Experimente zur fokalen Ischämie machen deshalb von Modellen Gebrauch, die auf einer Okklusion eben dieser Arterie

basieren. Ich gehe im Folgenden nur auf eine Auswahl an Methoden zur Schlaganfallinduktion ein.

1.5.2.1 Arterielle Gefäßversorgung des Gehirns

Die zerebrale Gefäßversorgung von Maus und Ratte ist der des Menschen sehr ähnlich. Die Blutzufuhr erfolgt über zwei verschiedene arterielle Gefäße: die *A. carotis communis* gibt für den Eintritt in die Schädelbasis die *A. carotis interna* ab und versorgt über Äste der *A. cerebri media* und *A. cerebri anterior* die medialen und vorderen Gehirnstrukturen (Arnold et al. 1999). Der hintere Teil des Gehirns wird über die *A. cerebri posterior* versorgt, die aus der *A. basilaris*, der Vereinigung der paarigen *Aa. vertebrales* (*Arteriae vertebrales*), hervorgeht (Arnold et al. 1999). In allen drei Lebewesen sind die drei Gehirnarterien über *Aa. communicantes* zu einem Gefäßkranz, dem *Circulus arteriosus cerebri* (*Willisi*), verbunden (s. Abbildung 3) (Rami et al. 2008).

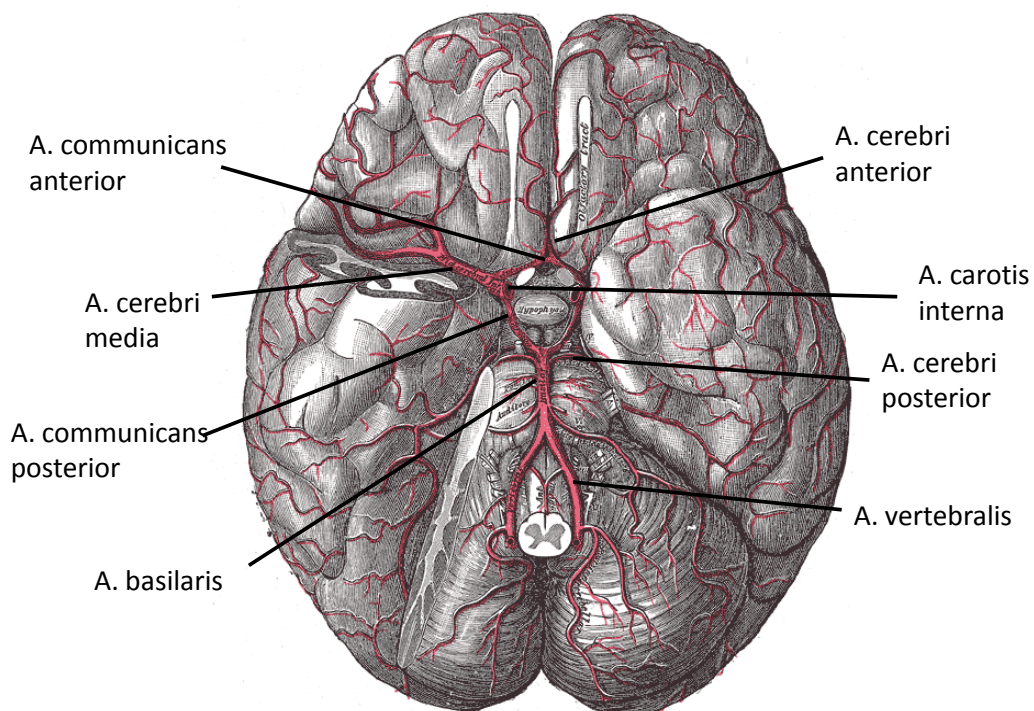


Abbildung 3: Arterielle Blutversorgung des Gehirns

Diese Abbildung wurde modifiziert nach Gray und Lewis (1918).

Die unilaterale Unterbindung der *A. carotis communis* (*Common carotid artery occlusion*) kann aufgrund von Kollateralkreisläufen nur dann erfolgreich für die Induktion eines Mediainfarktes eingesetzt werden, wenn die *Aa. communicantes posteriores* nicht ausgeprägt

sind, so wie es bei den Wüstenrennmäusen der Fall ist (Hossmann 2008). Aber auch dann ist durch die distale Lokalisation der Unterbindung mit großen Varianzen in den Infarktgrößen zu rechnen (Hossmann 2008).

1.5.2.3 Middle cerebral artery occlusion

Je nachdem, wo die *A. cerebri media* okkludiert wird, sind unterschiedliche Areale von ihrer Blutzufuhr abgetrennt. Eine distale Okklusion, die über eine transtemporale chirurgische Legierung oder Kauterisierung verursacht werden kann, beeinträchtigt fast ausschließlich neokortikales Gewebe, da die proximalen Abgänge der *A. cerebri media*, die sog. *Aa. lenticulostriatæ*, vom Eingriff nicht betroffen sind (Tamura et al. 1981). Okkludiert man allerdings die proximalen Anteile der Arterie, resultiert ein Schaden im gesamten Mediastromgebiet, einschließlich der Basalganglien (Baron et al. 2013).

Über den transorbitalen Zugang in die Schädelbasis lässt sich die Gefäßwurzel sehr gut erreichen (Hudgins und Garcia 1970). Allerdings können auf diesen invasiven Eingriff generalisierte Vasospasmen folgen, die auch Kollateralkreisläufe betreffen und dadurch bedingt Variationen in der Infarktgröße erzeugen können (Hossmann und Schuier 1980; Hossmann 2008).

Alternativ verwenden inzwischen viele Arbeitsgruppen, so auch unsere um Trendelenburg et al., das Modell der intraluminalen Gefäßokklusion. Hier wird über die *A. carotis communis* ein Silikon-beschichtetes Filament bis in die Anfänge der *A. cerebri media* vorgeschoben und hierdurch der Blutfluss unterbunden (Engel et al. 2011). Diese Methode kann sowohl permanente als auch transiente Ischämien induzieren (Engel et al. 2011). Über die Okklusionszeit kann Einfluss auf die Größe des Gewebeschadens genommen werden. Okklusionszeiten von mehr als 30 Minuten erzeugen schwere Infarkte, die zum Teil die gesamte Hemisphäre betreffen und mit einer hohen postischämischen Mortalität verbunden sind (Engel et al. 2011). Für milde Infarkte, die vor allem durch einen selektiven striatalen Zelluntergang gekennzeichnet sind, sollte die *A. cerebri media* nicht länger als 30 Minuten okkludiert werden (Katchanov et al. 2003). Zwar gibt es Hinweise dafür, dass sich der Gewebeschaden durch kurze Okklusionszeiten im zeitlichen Verlauf dem durch längere Okklusion angleicht, doch lassen sich deutliche Unterschiede im Langzeitüberleben nach milder und schwerer Ischämie feststellen (Du et al. 1996; Katchanov et al. 2003). Die Filament-Methode kommt den Schlaganfallabläufen im Menschen sehr nah, nur in der Reperfusion gibt es Schwierigkeiten, die langsame Durchblutungssteigerung der Klinik zu simulieren (Hossmann 2008).

Aus diesem Grund wird in der Forschung an der Thrombolyse auch auf die Methode des *Clot embolism* zurückgegriffen, bei ein Thrombus über einen Katheter in der Arterie platziert oder durch intraarterielle Thrombininjektionen produziert wird (Kilic et al. 1998; Baron et al. 2013).

Für die Forschung an den Mechanismen der postischämischen Inflammation ist die *Middle cerebral artery occlusion* (MCAO) ein beliebtes Schlaganfallmodell. Es wird auch für Versuche zur Beteiligung von Toll-ähnlichen Rezeptoren in diesem Entzündungsgeschehen verwendet.

1.6 Toll-ähnliche Rezeptoren

1.6.1 Familie der Toll-ähnlichen Rezeptoren

Toll-like receptors, im Deutschen "Toll-ähnliche Rezeptoren", spielen eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen, vor allem in der angeborenen Immunantwort (Aderem und Ulevitch 2000). Als Teil der *Pattern recognition receptors* (PRRs) setzen sie, aktiviert durch Bestandteile körperfremder Mikroorganismen, die als *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) zusammengefasst werden, im Rahmen von Infektionen die initiale Immunantwort in Gang (Medzhitov et al. 1997). Unerlässlich für die bisherige Forschung sind in diesem Zusammenhang Lipopolysaccharide (LPS), die als Zellbestandteile gramnegativer Bakterien als exogene Liganden der TLR2 und 4 gelten (Hoshino et al. 1999; Qureshi et al. 1999; O'Neill et al. 2013). Auch Zellbestandteile, die im Rahmen von endogenen zelldestruktiven Prozessen wie dem Schlaganfall freigesetzt werden, können als sogenannte *Damage associated molecular patterns* (DAMPs) von TLR-positiven Zellen erkannt werden und gleiche Signalkaskaden wie bei exogener Pathogenerkennung aktivieren (Li et al. 2001).

Bislang sind zehn funktionelle menschliche TLRs bekannt (Rock et al. 1998; Hanisch et al. 2008). Als Transmembranproteine befinden sie sich u.a. in der Plasmamembran von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen, Th1- und Th2- $\alpha\beta$ -Zellen, sowie in einigen Epithel- und B-Zellen (Medzhitov et al. 1997). TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 befinden sich intrazellulär in den Membranen von Endosomen (Latz et al. 2004; Vollmer et al. 2005). Trotz unterschiedlicher Lokalisationen, Signalwege und Funktionen ist der Aufbau der TLRs sehr ähnlich. Ihre extrazelluläre Domäne besteht aus einer Vielzahl an Leucin-reichen Repeats (*Leucin-rich repeats*, LRRs), ihre intrazelluläre Domäne ist

strukturell mit dem IL-1 Rezeptor verwandt und wird demnach auch als *Toll/IL-1 receptor homology domain* (TIR-Domäne) bezeichnet (Hashimoto et al. 1988; Gay und Keith 1991).

Über Homo- oder Heterodimerisierung und über die Bindung von Adaptormolekülen werden intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt (Medzhitov et al. 1997; Ozinsky et al. 2000a; Ozinsky et al. 2000b). Hier wird zwischen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen unterschieden (s. Abbildung 4).

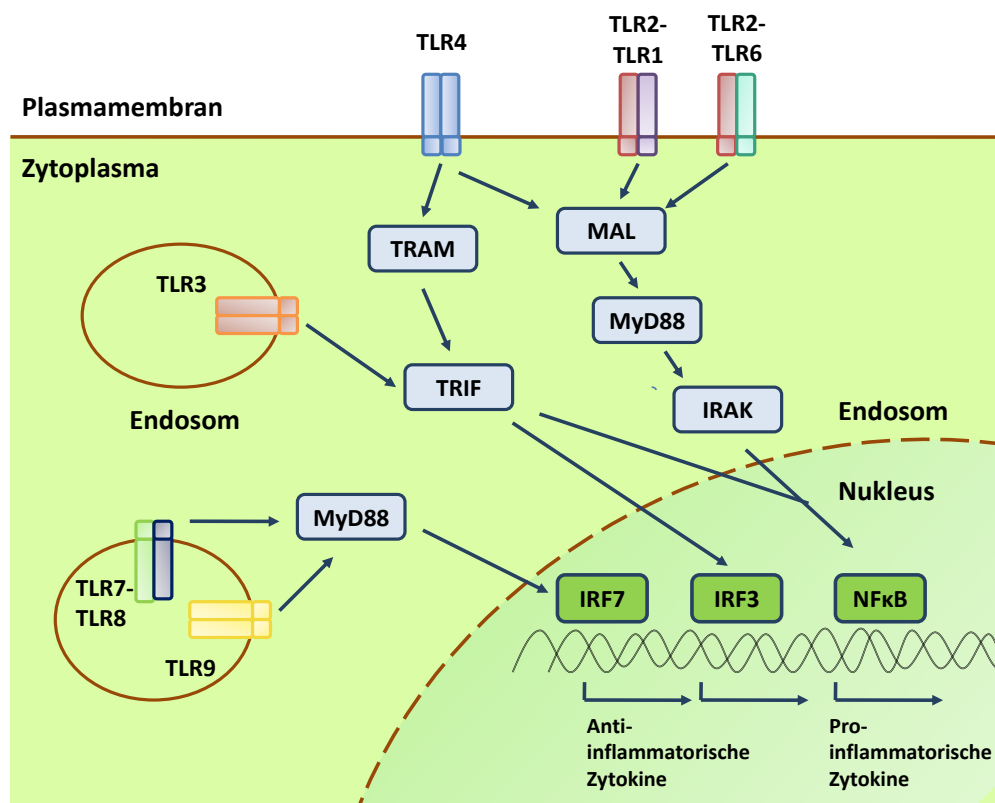


Abbildung 4: Humane TLR-Rezeptoren und ihre Signalwege

Diese Abbildung ist eine vereinfachte Veranschaulichung der TLR-Signalwege und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

IRAK = *IL-1 receptor-associated kinase*, IRF = *Interferon regulatory factor*, MAL = *MyD88 adaptor-like protein*, MyD88 = *Myeloid differentiation primary response gene 88*, NFκB = *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*, TLR = *Toll-like receptor*, TRAM = *TRIF-related adaptor molecule*, TRIF = *TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-β*

Das Adaptormolekül *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) kommt bei allen TLRs außer TLR3 vor und führt über die Aktivierung von *Interleukin-1 receptor-associated kinases* (IRAKs) zu einer Aktivierung des *Nuclear factor-κB* (NF-κB) (s. Abbildung 4)

(Medzhitov et al. 1997; Medzhitov et al. 1998; Alexopoulou et al. 2001). Dieser transkribiert u.a. *messenger ribonucleic acid* (mRNA) für proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-6 und IL-1 β (Gesuete et al. 2014).

Als MyD88-unabhängige Signalkaskaden sind mit dem *MyD88 adaptor-like protein* (MAL), *TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon- β* (TRIF) und dem *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) drei Adaptormoleküle bekannt, die zum Teil über andere Kinasen und Transkriptionsfaktoren die Transkription von pro- aber auch antiinflammatorischen Zytokinen induzieren (Kawai et al. 1999; Horng et al. 2001; Yamamoto et al. 2002; Fitzgerald et al. 2003; Oshiumi et al. 2003) (s. Abbildung 4).

1.6.2 TLR4-Rezeptoren und ihre Funktion in der postischämischen Inflammation

Toll-ähnliche Rezeptoren 4 (TLR4) sind die zuerst entdeckten Rezeptoren der Familie der TLR (Medzhitov et al. 1997; O'Neill et al. 2013). Sie spielen nicht nur eine Rolle im Kontext von Sepsis oder kardiologischen Erkrankungen, sondern auch im Entzündungsgeschehen nach einer zerebralen Ischämie. Dies erklärt sich durch ihr Vorkommen in residenten zerebralen Zellen wie kortikalen Neuronen, Astrozyten und Mikroglia (Bowman et al. 2003; Olson und Miller 2004; Hua et al. 2007; Tang et al. 2007; Gosemann et al. 2010; Trotta et al. 2014).

Aktiviert werden TLR4 entweder exogen über die Erkennung von LPS (s. Kapitel 1.6.1) oder durch *DAMPs* als endogene Liganden, zu denen unter anderem die *High-mobility group box 1* (HMGB1), die Hitze-Schock-Proteine HSP60, HSP70, Fibronectin oder Hyaluronan gehören (Poltorak et al. 1998; Hoshino et al. 1999; Ohashi et al. 2000; Okamura et al. 2001; Vabulas et al. 2002; Jiang et al. 2005; Apetoh et al. 2007).

Für die Erkennung dieser Liganden benötigt der Toll-ähnliche Rezeptor 4 den Kofaktor *Myeloid differentiation factor 2* (MD-2), ein Protein, das sich an der extrazellulären Domäne des Rezeptors befindet (Shimazu et al. 1999). Nach Stimulation homodimerisiert der Rezeptor und aktiviert im Gegensatz zu anderen Toll-ähnlichen Rezeptoren sowohl MyD88-abhängige und -unabhängige Signalkaskaden, über die eine Reihe an pro- und antiinflammatorischen Zyto- und Chemokinen sowie Enzymen freigesetzt werden (s. Kapitel 1.6.1) (Shimazu et al. 1999; Ozinsky et al. 2000a). Seit Kurzem ist auch bekannt, dass der TLR4 bei einer Inhibition der Caspase-8 und somit der Apoptose über TRIF-abhängige, aber IRF-3 und *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B)-

unabhängige Signalwege nekroptotischen Zelluntergang induzieren kann (He et al. 2009; He et al. 2011; Newton et al. 2014; Schworer et al. 2014).

Im Schlaganfall werden die TLR4-Rezeptoren vermehrt von aktivierter Mikroglia exprimiert und über *Damage-associated molecular patterns* nekrotischer Zellen stimuliert (Lehnardt et al. 2002; Hanisch et al. 2008). Die in Kapitel 1.2.3 beschriebene Freisetzung von TNF α , IL-1 β , IL-6 und der MMP-9 wird somit über TLR4-Rezeptor-induzierte Signalwege gesteigert (Caso et al. 2007; Bell et al. 2013).

Studien mit TLR4-Knockout-Mäusen bzw. Stimulations-hyporesponsiven-Mutanten haben zeigen können, wie groß der Einfluss des *Toll-like receptor 4* auf den postischämischen Gewebeschaden zu sein scheint. In verschiedenen Versuchsmodellen bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten der postischämischen Entzündungsreaktion waren die Infarkt volumina der TLR4-defizienten Mäuse signifikant kleiner als die der Kontrollgruppe aus Wildtypmäusen, das neurologische Defizit geringer ausgeprägt und auch Entzündungsmarker und -Enzyme wie IL-1 β , TNF α , die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), die Cyclooxygenase 2 (COX-2) oder die MMP-9 vermindert nachweisbar (Lehnardt et al. 2003; Cao et al. 2007; Caso et al. 2007; Tang et al. 2007). Auch sind TLR4-Polymorphismen bestimmter chinesischer ethnischer Populationen mit Schlaganfällen assoziiert (Lin et al. 2005).

1.6.3 Aktueller Stand der Forschung: TLR4-Inhibitor als möglicher Therapieansatz

Die in Kapitel 1.6.2 beschriebenen Versuche mit genetisch veränderten Mäusen zeigen deutlich, dass sich eine TLR4-Defizienz positiv auf das neurologische Outcome nach zerebraler Ischämie auswirkt (Lehnardt et al. 2003; Cao et al. 2007; Caso et al. 2007; Tang et al. 2007).

Um aber von diesen Erkenntnissen auf einen therapeutischen Nutzen für die Schlaganfalltherapie zu schließen, bedarf es neben den Ergebnissen mit transgenen Tieren einer Untersuchung der TLR4-Inhibition mit pharmakologischen Substanzen oder Antikörpern.

Zu Beginn meiner Arbeit war bereits von Suzuki et al. (2012) bzw. im Rahmen der arbeitsgruppeninternen Promotionsarbeiten von Sarah Grünwald und Konstantina Theodorou gezeigt worden, dass eine pharmakologische bzw. Antikörper-induzierte TLR4-Inhibition über verschiedene Applikationswege die Infarktvolumina nach 2-stündiger MCAO und 22-stündiger Reperfusion (Suzuki et al. 2012) bzw. 45-minütiger MCAO und

48-stündiger Reperfusion reduziert und das funktionelle Outcome verbessert. Kürzlich zeigten auch Hua et al. (2015) ähnliche Effekte bei TLR4-Inhibition durch Resatorvid nach einstündiger MCAO und 3-, 8- oder 24-stündiger Reperfusion. Erfolgreiche Versuche über längere Reperfuionszeiträume waren bislang nur an TLR4-defizienten Tieren erfolgt (Caso et al. 2007). Eine Untersuchung der Langzeitwirkung der TLR4-Inhibition durch TAK-242 (Resatorvid) bzw. dem TLR4-Antikörper MTS510 ist noch nicht durchgeführt worden.

Im Folgenden verwende ich zur besseren Unterscheidung zwischen den Reperfuionszeiten der verschiedenen Studien bei Experimenten mit einer Reperfuionszeit von maximal 72 Stunden den Begriff des "Kurzzeitversuchs", Experimente mit 7-14 Tagen Reperfuionszeit fallen in dieser Arbeit unter die Beschreibung "Langzeitversuch".

In Bezug auf meine eigene Arbeit impliziert der Begriff "Kurzzeitversuch" eine Reperfuionszeit von 48 Stunden. Dem "Langzeitversuch" dieser Arbeit liegt eine Reperfuionszeit von 14 Tagen zugrunde, dem "Pilotversuch" eine Reperfuionszeit von 7 Tagen.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Aus der Einleitung wird deutlich, dass der Toll-ähnliche Rezeptor 4 eine wichtige Rolle in der akuten postischämischen Entzündung spielt. Auch haben verschiedenste Studien zeigen können, dass in der TLR4-Inhibition nach zerebraler Ischämie ein großes therapeutisches Potenzial steckt (Cao et al. 2007; Caso et al. 2007; Suzuki et al. 2012).

Im Gegensatz zu Studien mit TLR2-Knockoutmäusen ließen sich in Experimenten mit TLR4-Knockoutmäusen auch zu Zeitpunkten der späten Immunantwort (7 Tage) noch neuroprotektive Effekte der TLR4-Defizienz nachweisen (Caso et al. 2007; Bohacek et al. 2012). Ob diese Effekte auch nach einmaliger TLR4-Inhibition festzustellen sind, wurde bislang nicht erforscht. Hier beschränken sich die untersuchten Zeitpunkte auf die Akutphase der Entzündung (bis zu 72 Stunden (Bohacek et al. 2012)).

Die Kenntnis über langfristige Folgen der TLR4-Inhibition aber ist essentiell, um beurteilen zu können, ob sie eine therapeutische Zukunft hat.

Diese Arbeit hat zum Ziel, in einem Modell der transienten fokalen zerebralen Ischämie die Langzeiteffekte der TLR4-Inhibition zu untersuchen und hierüber der Antwort auf die Frage nach einem therapeutischen Nutzen näherzukommen. In den arbeitsgruppeninternen Kurzzeitversuchen mit 45-minütiger MCAO und 48-stündiger Reperfusion und unterschiedlichen Applikationsweisen des TLR4-Antikörpers (i.p., i.v., i.a.) hatte die intraarterielle Applikationsform den größten Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren hervorgerufen, sodass diese für die vorliegende Arbeit gewählt wurde.

3 Material und Methoden

3.1 Material und Geräte

Tabelle 1: wichtige verwendete Geräte und Softwareprogramme

Produkt	Hersteller
Adobe Photoshop CS4 Extended, Version 11.0	Adobe Systems, Incorporated, USA
Anästhesiesystem für Isofluran	Dräger, Lübeck
Axio Cam MRm	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Axio Examiner. Z1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
AxioVision40 V 4.8.2.0	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Cryoschneidemaschine CM 3050S	Leica, Wetzlar
Fluoreszenzlampe HXP 120C	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software, Incorporated, USA
Homeothermic Blanket Control Unit	Harvard Apparatus, USA
ImageJ 1.47v	National Institutes of Health, USA
Kühle Lichtquelle KL 1500 LCD	Schott, Jena
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Laser-Doppler PeriFlux System 5000	Perimed, Schweden
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

Tiermedizinische Erholungskammer	Peco Services Ltd, UK
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
Wärmekammer	Peco Services Ltd., UK
Zen Version 1.0.0.0	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena

Tabelle 2: verwendetes chirurgisches Material

Produkt	Hersteller
3-0 Faden , Seide, FS-1, Rundnadel 24 mm B/8c	Ethicon, USA
5-0 Faden, Polyester	Ethicon, USA
6-0 fine MCAO Suture L910 PK5Re	Docol Corporation, USA
Chirurgische Schere (Surgical scissors)	Fine Science Tools, USA
Feine Schere (Extra Fine Bonn Scissors)	Fine Science Tools, USA
Gebogene Dumont Pinzetten #7 (Dumont forceps)	Fine Science Tools, USA
Gefederte Schere (Spring Scissors)	Fine Science Tools, USA
Gehirnschneider	Asi instruments, USA
Kleiner Nadelhalter (Olsen-Hegar Needleholder)	Fine Science Tools, USA
Mikrovaskularklemme (Microvascular clamp)	Fine Science Tools, USA
Mirco Cannula, 0,4 mm O.D., 0,2 mm I.D.	Fine Science Tools, USA
Mittelgroße Schere (Standard Pattern Scissors)	Fine Science Tools, USA
Nadelhalter (Needle holder)	Fine Science Tools, USA
Pinzette (Applying forceps for micro clamp)	Fine Science Tools, USA

Pinzette (Cover Glass Forceps)	Fine Science Tools, USA
Pinzette (Student adson forceps)	Fine Science Tools, USA
Rasierklingen Isana Men	Rossmann, Hannover
Spitze Pinzette #5CO (medical forceps – Dumostar Biologie Tip)	Fine Science Tools, USA

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
0,5 ml Reagenzgefäße	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Reagenzgefäße	Eppendorf, Hamburg
15 ml Reagenzröhrchen, Falcon	BD, USA
18 G – Kanülen, BD Microlance™	BD, USA
2,0 ml Reagenzgefäße	Eppendorf, Hamburg
2,3,5 – Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	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
Accelerator	Bob Smith Industries, USA
BD Plastikpak™ 1ml-Spritze	BD, USA
Buprenorphin (Temgesic®)	Essex Chemie AG, Schweiz
Ceftriaxon	Hikma, Klein-Winternheim
Citratpuffer	s. Protokoll im Anhang
Cryomold Standard Specimen Molds	Sakura Tissue Tek, USA
D-Sukrose	Fluka Analytical, Schweiz
DAPI BioChemica	AppliChem GmbH, Darmstadt

Deckgläser, 24x48 mm	Menzel, Braunschweig
Essigsäure Emsure®	Merck, Darmstadt
Ethanol 99 %	Chemie-Vertrieb Hannover
Ethanol absolute Emplura®	Merck, Darmstadt
Fettstift Dako Pen	DAKO, Dänemark
Fluoro-Jade C	Histo-Chem, Incorporated, USA
Gewebekulturschalen, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Glukose 5 %, Injektionslösung	Braun, Melsungen
Immu-Mount (20 ml)	Thermo Scientific, USA
Injekt®-F 1 ml -Spritze ohne Totraumvolumen	Braun, Melsungen
Isofluran (Forene®)	Abott, Schweiz
Kaliumpermanganat	FlukaChemika, Schweiz
Lidocainhydrochlorid (Gelicain® 2 % Gel)	Actavis, München-Riem
NaCl	Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg
Natriumhydroxid	FlukaChemika, Schweiz
Objektträger, Superfrost® Plus	Menzel, Braunschweig
Parafilm M®	Pechiney Plastic Packaging, USA
Pattex® Sekundenkleber	Henkel, Düsseldorf
PBS	s. Protokoll im Anhang
PBS pH 7,4, steril	Life technologies gibco, USA
PFA pH7 Roti®-Histofix 4 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti®-Histokitt II	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Shandon Cryomatrix	Thermo Scientific, USA
Sonde für Laser-Doppler	Perimed, Schweden
TBS	s. Protokoll im Anhang

Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Triton-X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tuberkulinspritzen (25 G), Omnifix®-F, 1 ml	Braun, Melsungen
Wattestäbchen	Beese Medical, Barsbüttel
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 4: Tierarten und Züchter

Tierspezies	Züchter
C57 BL/6N Maus	Charles River Laboratories, Sulzfeld
C57 BL/6N Maus	Janvier Labs, Frankreich

Tabelle 5: verwendete Antikörper

Produkt	Spezies	Hersteller	Bestellnummer
Polyklonale Primärantikörper			
Anti-GFAP	Huhn	Merck Millipore, USA	AB5541
Anti-Iba1	Kaninchen	Wako Chemicals GmbH, Neuss	019-19741
Anti-NeuN	Kaninchen	Merck Millipore, USA	ABN78
Anti-TLR4	Kaninchen	Abcam, UK	ab13556
Monoklonale Primärantikörper			
Anti-Iba1/AIF1	Maus	Merck Millipore, USA	MABN92
Anti-Mouse TLR4/MD2 Complex Functional Grade Purified	Ratte	Affymetrix eBioscience, USA	16-9925
Anti-NeuN	Maus	Merck Millipore, USA	MAB377

Polyklonale Sekundärantikörper			
Anti-Rabbit, Cy3-konjugiert	Esel	Jackson Immuno, UK	711-165-152
Anti-Mouse, Cy5-konjugiert	Esel	Jackson Immuno, UK	715-175-150
Anti-Chicken, FITC- konjugiert	Esel	Jackson Immuno, UK	703-095-155

3.2 Methoden

3.2.1 Middle cerebral artery occlusion

Die MCAO wurde nach einem modifizierten Protokoll von Engel et al. (2011) durchgeführt (Engel et al. 2011) und durch das eigenständig erarbeitete Prozedere der intraarteriellen Applikation ergänzt (s. Kapitel 3.2.2).

Für die Einleitung der Narkose wurde 2,5 %iges Isofluran in 100 % Sauerstoff bei einem Fluss von 0,8 l/ min gegeben. Die Operation wurde mit 2 % Isofluran fortgeführt. Vor Operationsbeginn wurde zur Analgesie 0,1 mg Buprenorphin/ kg Körpergewicht appliziert. Vor dem ersten Hautschnitt wurde Bepanthensalbe auf die Augen gegeben, um sie vor dem Austrocknen zu schützen. Über eine Wärmeplatte wurde die Körpertemperatur während der gesamten Operation auf 36-37 °C gehalten.

Um Blutungen während und nach der Operation zu vermeiden, wurden zunächst die rechte *Arteria carotis communis* (RCCA) sowie die rechte *Arteria carotis externa* (RECA) mit einem 5-0 Faden aus Polyester abgebunden und die rechte *Arteria carotis interna* (RICA) bis zur Applikation des Antikörpers bzw. der *Phosphate-buffered saline* (PBS) mit einem Mikroclip abgeklemmt. Ein weiterer 5-0 Faden wurde als Sicherungsfaden um die *Arteria carotis communis* gelegt (s. Abbildung 5B).

Vor der Okklusion wurde den zu behandelnden Tieren 50 µl Antikörper-Lösung und den Tieren der Kontrollgruppe 50 µl reines PBS über einen Katheter in die RCCA appliziert (s. Kapitel 3.2.2).

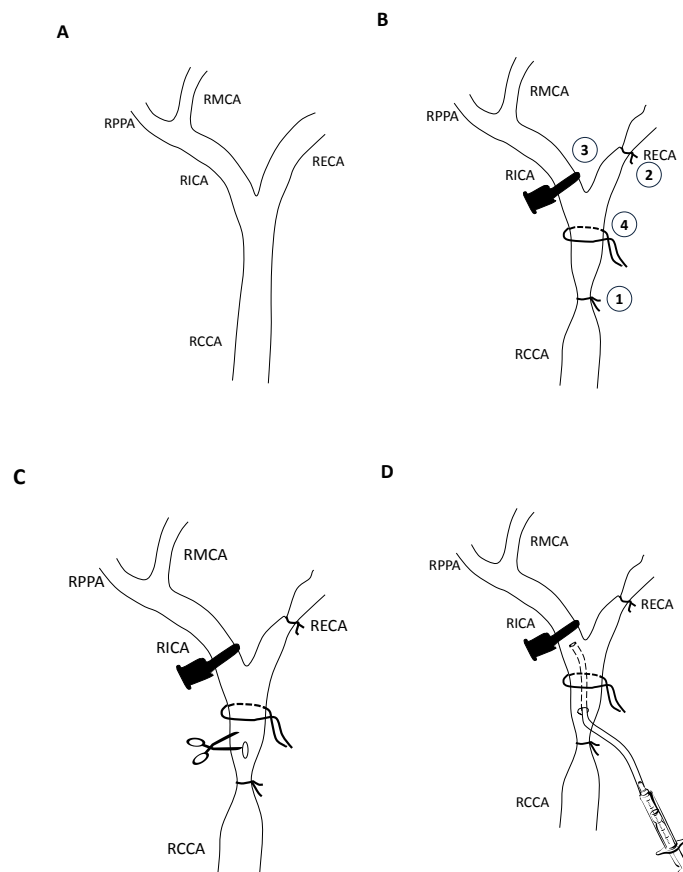
Für die Okklusion wurde ein Silikon-beschichtetes Filament über dasselbe Loch in der RCCA über die RICA bis in die proximale rechte *Arteria cerebri media* (RMCA) geschoben.

Dazu wurde der Mikroclip an der RICA endgültig entfernt und das Filament mit dem Sicherheitsfaden an der RCCA fixiert (s. Abbildung 5F - G).

Der regionale zerebrale Blutfluss im Bereich des rechten Temporal- bzw. Parietallappens wurde mit Hilfe eines Laser-Dopplers gemessen und so der Verschluss der RMCA überprüft. Die Doppler-Sonde aus flexibler Faseroptik wurde unmittelbar vor dem eigentlichen Eingriff auf die Schädeldecke im Durchblutungsbereich der *A. cerebri media* geklebt. Durchblutungswerte wurden vor, während und nach der MCAO dokumentiert.

Bei Operationen mit 30-minütiger MCAO wurde die Maus unmittelbar nach der Okklusion der *A. cerebri media* in eine auf 37 °C beheizte tiermedizinische Kammer gesetzt und zur Reperfusion erneut narkotisiert. Durch die dadurch erreichten kurzen Narkosezeiten wurde die neuroprotektive Isofluranwirkung so gering wie möglich gehalten (Sakai et al. 2007).

Bei 15-minütiger Okklusion wurde die Maus für die gesamte Dauer der Operation in Narkose belassen. Um die Okklusion zu terminieren, wurde das Filament gezogen und die RCCA proximal des Loches mit dem Sicherungsfaden abgebunden, damit keine Blutung folgte (s. Abbildung 5H). Anschließend wurde die Dopplersonde entfernt, die Hautschnitte zugenäht und die Maus bis zum vollständigen Erwachen in einen beheizten Aufwachkäfig gesetzt.



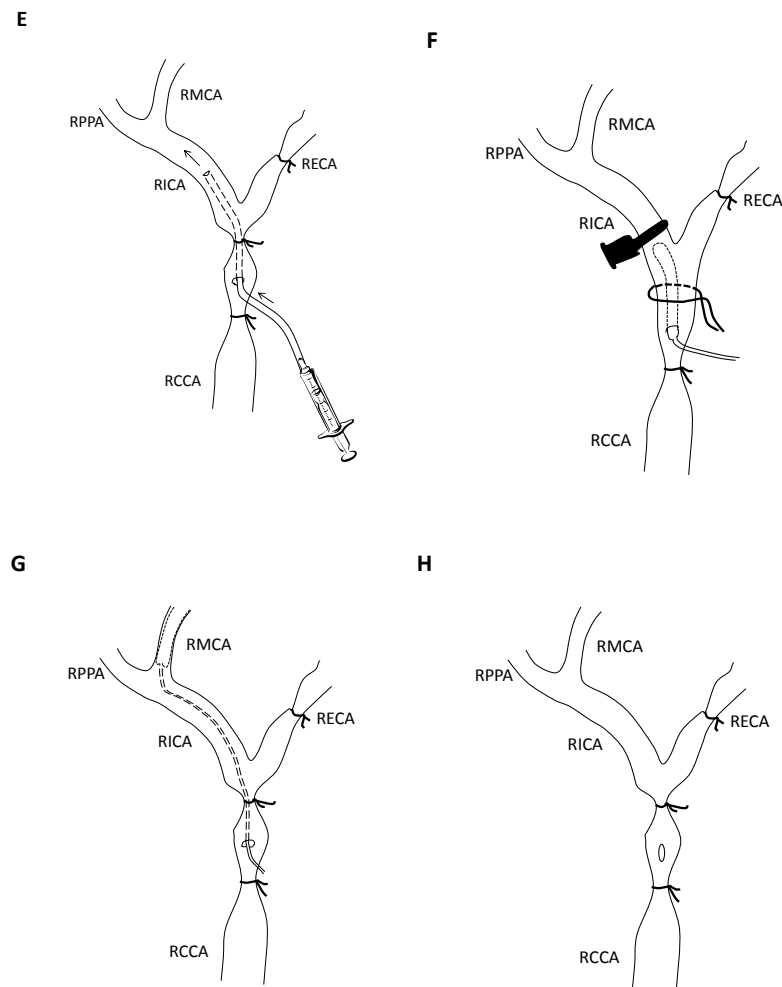


Abbildung 5: Durchführung der MCAO mit intraarterieller Applikation

(A-H) Schematischer Ablauf der MCAO mit intraarterieller Applikation von Flüssigkeiten

(A) Verzweigungen der RCCA vereinfacht dargestellt (B) Abbinden bzw. Abklemmen der RCCA, RECA sowie RICA (C) Schneiden des Loches in die RCCA (D) Positionierung des Katheters in RCCA (E) Flüssigkeitsapplikation (F) Einfädeln des Filaments in die RCCA (G) *Middle cerebral artery occlusion* (H) Zustand nach MCAO

RMCA = rechte *Arteria cerebri media*, RPPA = rechte *Arteria pterygopalatina*, RICA = rechte *Arteria carotis interna*, RECA = rechte *Arteria carotis externa*, RCCA = rechte *Arteria carotis communis*

3.2.2 Intraarterielle Applikation

Die Hälfte aller Tiere erhielt über intraarterielle Katheterapplikation einmalig 1 µg in sterilem PBS gelösten TLR4/MD2-Antikörper MTS510 (künftig nur noch: TLR4-Antikörper). Bei einer Antikörperkonzentration von 1 µg/ml und einem Antikörper-PBS-Verhältnis von 1:50 wurden insgesamt 150 µl Flüssigkeit, davon 3 µl TLR4/MD2-

Antikörper und 147 µl PBS, aufgezogen, um trotz des Totraumvolumens der Spritze und des Katheters 50 µl Flüssigkeit und somit die in vorausgegangenen Experimenten neuroprotektiv wirkende Antikörpermenge von 1 µg in die Arterie zu überführen.

Der Kontrollgruppe wurden auf gleiche Art 50 µl reines steriles PBS in die RCCA gespritzt.

Hierfür wurde nach der Ligatur der *A. carotis communis* sowie der *A. carotis externa* und dem Abklemmen der *A. carotis interna* mit einer gefederten Schere ein ca. 0,5 mm großes Loch in die *Arteria carotis communis* geschnitten und mit einer spitzen Dumont Pinzette offengehalten, während der führungsdrahtlose Katheter mitsamt Spritze und aufgezogener Flüssigkeit mit einer gebogenen Dumont Pinzette an das Loch herangeführt und in der Arterie platziert wurde (s. Abbildung 5D). Anschließend wurde das an die Spritze angeschlossene Ende des Katheters mit Durapore™ auf dem Mausekörper in einer Linie zur RCCA fixiert und das freie Katheterende mit dem Sicherungsfaden an die Arterie gebunden, um ein Austreten der Flüssigkeit aus der Arterie zu vermeiden.

Für die Zeitspanne der Applikation (30 Sekunden/ Applikation) wurde der Mikroclip an der RICA geöffnet und sofort nach Applikationsende wieder verschlossen, um das Verteilen in der Infarktregion sicherzustellen und Nachblutungen und somit Antikörperverlust in den perivasalen Raum zu verhindern (s. Abbildung 5E).

3.2.3 Postoperative Versorgung

Direkt nach der Reperfusion erhielten alle Tiere nochmals Bepanthensalbe auf die Augen, um sie auch während der Aufwachphase vor einem Austrocknen der Augen zu schützen.

Allen Tieren wurde nach Beendigung der MCAO 1 ml sowie 24 und 48 Stunden *post reperfusionem* jeweils 0,5 ml Kochsalzlösung subkutan gespritzt (Weiss et al. 2003), um eine Exsikkose zu vermeiden.

In der postoperativen Phase wurden alle Tierkäfige mit Moltex-Unterlagen, Plastikhäuschen und Breifutter ausgestattet, zu denen die operierten Tiere ebenfalls freien Zugang hatten.

3.2.3.1 Analgesie

Die analgetische Nachbehandlung erfolgte abhängig vom Versuchsmodell entweder in Form von 0,1 mg/ Buprenorphin/ kg Körpergewicht, das in den ersten 48 Reperfusionstunden alle 12 Stunden intraperitoneal appliziert wurde (s. Kapitel 4.1 sowie

4.2.1) oder in Form von Lidocain-Gel, das direkt nach Beendigung der Operation sowie 24 Stunden *post reperfusionem* auf die Wundnähte aufgetragen wurde (s. Kapitel 4.2.2, 4.2.3 sowie 4.3).

3.2.3.2 Antibiotikabehandlung

Im Verlauf der Experimente wurde die postoperative Antibiotikatherapie in den Versuchsaufbau eingeführt (s. Kapitel 4.2.2). In diesen Experimenten wurde unmittelbar nach Reperfusionbeginn sowie 24 und 48 Stunden nach Reperfusion sowohl Tieren der Behandlungs- als auch der Kontrollgruppe 200 mg Ceftriaxon/ kg Körpergewicht intraperitoneal gespritzt, um das Risiko für postoperative Infektionen als Folge der Schlaganfall-induzierten Immundefizienz zu senken (Prass et al. 2003; Meisel et al. 2004; Thöne-Reineke et al. 2008; Nederkoorn et al. 2011).

3.2.3.3 postoperative Käfigtemperatur

Um einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes als Folge des operativen Eingriffes entgegenzuwirken, wurden die Tiere in den ersten 72 Stunden nach der Reperfusion nicht transportiert, sondern im Operationsraum gehalten. Tagsüber hielten Wärmeplatten die Käfigtemperatur auf 24 °C, nachts wurden die Käfige abgedeckt, um eine weitere Wärmeisolation und einen der Tierhaltung entsprechenden Tag-Nacht-Rhythmus zu gewährleisten.

3.2.4 Haltung der Tiere

Die Tiere wurden in der Tierhaltung der Universitätsmedizin Göttingen unter Tageslicht-ähnlichen Bedingungen gehalten. Sie hatten zu jeder Zeit *ad-libitum*-Zugang zu Wasser und Futter. Maximal fünf Tiere wurden in einem Käfig gehalten. Bei Streitigkeiten unter den Mäusen wurden die streitsuchenden Tiere in Einzelkäfige gesetzt.

3.2.5 Ausschlusskriterien

Aus der Auswertung wurden alle Tiere ausgeschlossen, die innerhalb von sechs Stunden nach Operationsende infolge des invasiven Eingriffs verstarben.

Tiere, bei denen während der MCAO kein reduzierter Blutfluss beobachtet werden konnte, wurden ebenfalls nicht ausgewertet, da bei ihnen kein Infarkt anzunehmen war. Zusätzlich wurden nur Tiere von einem Doppler-Abfall von mindestens 70 % ihres Ausgangswertes zu Beginn der Operation ausgewertet.

Tiere, die innerhalb von 48 Stunden 20 % oder mehr ihres ursprünglichen Körpergewichts verloren, wurden frühzeitig aus dem Experiment genommen und nur in Bezug auf physiologische Parameter, Neuroscores und Überleben in die Auswertung eingeschlossen. Auch ein drastischer Temperaturabfall auf weniger als 24 °C Oberflächentemperatur ohne Erholung innerhalb von 24 Stunden führte zum vorzeitigen Ausscheiden aus dem Experiment mit oben genannten Einschränkungen in der Auswertung.

Der Umgang mit den Tieren sowie das Operationsprozedere entsprachen den *Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research (Society for Neuroscience)* sowie den institutionellen und nationalen Richtlinien. Alle Experimente wurden vom niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LaVeS) genehmigt (Nummer: 33.9-42502-04-12/849).

3.2.6 Randomisierung und Verblindung

Die Behandlung und Auswertung der Tiere wurde konsequent verblindet und randomisiert durchgeführt. Die Entblindung erfolgte erst nach Abschluss aller Experimente und Auswertungen.

3.2.7 Neurologisches Scoring

Alle Tiere wurden vor dem Eingriff, nach 24, 48 und 72 Stunden sowie nach 7 und 14 Tagen *post reperfusionem* neurologisch getestet.

Neurologische sensorisch-motorische Defizite wurden unterteilt in: kein Defizit (0), Fehlvermögen, die kontralaterale Vorderpfote auszustrecken (1), Drehen zur kontralateralen Seite (2), kein Stellungsreflex mehr (3) und Tod (4) (s. Tabelle 6) (Bederson et al. 1986; Hara et al. 1996; Harhausen et al. 2010).

Ergänzt wurden diese Testungen durch eine modifizierte Variante der *modified Neurological Score Scale* (Garcia et al. 1995; Li et al. 2000; Hua et al. 2009). Diese implizierte fünf verschiedene Tests. Die ersten drei Testungen betrachteten mögliche motorische Beeinträchtigungen, die anderen beiden Tests erfassten sensorische Defizite. Ausgeführt werden die einzelnen Tests und ihre Bewertung in Tabelle 7.

Grundsätzlich wurden starke Einschränkungen je Test mit einem Punkt bewertet, keine Einschränkungen mit drei Punkten. Maximal war ein Tagesscore von 15 Punkten möglich, minimal, im Falle eines vorzeitigen Todes, 0 Punkte (Hua et al. 2009).

Tabelle 6: Bederson-Score

Score 0	Die Maus zeigt keine motorischen Defizite.
Score 1	Die Maus kann die Vorderpfote nicht mehr strecken.
Score 2	Die Maus dreht sich zur kontralateralen Seite.
Score 3	Die Maus zeigt keinen Haltungsreflex mehr.
Score 4	Die Maus ist tot.

Tabelle 7: modified Neurological Score Scale

Motorische Tests	
<p><u>Spontanaktivität</u></p> <p>Die Maus wird in einen frischen Käfig, der nur Sägespäne enthält, gesetzt und für 5 Minuten beobachtet.</p>	<p>Score 3: <i>normale Erkundungsreaktion</i></p> <p>Die Maus bewegt sich im Käfig und erkundet mindestens drei Wände.</p>
	<p>Score 2: <i>leichte Beeinträchtigung</i></p> <p>Die Maus bewegt sich im Käfig und nähert sich mindestens einer Wand.</p>
	<p>Score 1: <i>starke Beeinträchtigung</i></p> <p>Die Maus zeigt kein exploratives Verhalten und bewegt sich insgesamt kaum.</p>
	<p>Score 0: <i>Tod</i></p>
<p><u>Klettern</u></p> <p>Die Maus wird an ein senkrecht stehendes Metallgitter gesetzt und bis zu 3 Minuten lang beobachtet. Beim Wegnehmen der Maus wird untersucht, wie stark sie sich am Gitter festhält.</p>	<p>Score 3: <i>normale Erkundungsreaktion</i></p> <p>Die Maus klettert behände und klammert sich fest an das Gitter.</p>
	<p>Score 2: <i>leichte Beeinträchtigung</i></p> <p>Eine Seite ist eingeschränkt. Das Festhalten erfolgt mit weniger Kraft.</p>
	<p>Score 1: <i>starke Beeinträchtigung</i></p> <p>Die Maus scheitert am Klettern (oder fällt). Anstelle von Klettern dreht sie sich im Kreis.</p>
	<p>Score 0: <i>Tod</i></p>

<p><u>Gleichgewicht und Koordination</u></p> <p>Die Maus wird in 45 cm über dem Boden befindliche Stange mit einem Durchmesser von 1,5cm gesetzt und bis zu 1,5 Minuten beobachtet.</p> <p>Die Stange ist mit Leukoplast umwickelt, damit sie besseren Halt bietet.</p>	<p>Score 3: normale Erkundungsreaktion</p> <p>Die Maus hält sich an der Stange fest und läuft zu einem der beiden Enden.</p>
	<p>Score 2: leichte Beeinträchtigung</p> <p>Die Maus hält sich fest, läuft aber nicht.</p>
	<p>Score 1: starke Beeinträchtigung</p> <p>Die Maus hält sich kurz fest und fällt sofort oder aber nach einiger Zeit von der Stange (Der Untersucher sollte ein tatsächliches Fallen verhindern).</p>
	<p>Score 0: Tod</p>
<p>Sensorische Tests</p>	
<p><u>Ohrmuschelreflex</u></p> <p>Der äußere Gehörgang wird mit einem Wattestäbchen berührt und die Reaktion (Kopfbewegung, Kopfschütteln, Bewegung der Ohrmuschel) beobachtet.</p>	<p>Score 3: normale Erkundungsreaktion</p> <p>Die Maus zeigt rechts und links einer Reaktion gleicher Intensität.</p>
	<p>Score 2: leichte Beeinträchtigung</p> <p>Die Reaktion auf der beeinträchtigten Seite ist verlangsamt.</p>
	<p>Score 1: starke Beeinträchtigung</p> <p>Auf der beeinträchtigten Seite erfolgt keine Reaktion auf den Stimulus.</p>
	<p>Score 0: Tod</p>
<p><u>Körperwahrnehmung</u></p> <p>Die Maus wird im seitlichen Halsbereich mit einem Wattestäbchen berührt und die Reaktion (Kopfschütteln, Ausweichbewegung) beobachtet.</p>	<p>Score 3: normale Erkundungsreaktion</p> <p>Die Maus zeigt rechts und links einer Reaktion gleicher Intensität.</p>
	<p>Score 2: leichte Beeinträchtigung</p> <p>Die Reaktion auf der affektierten Seite ist verlangsamt.</p>
	<p>Score 1: starke Beeinträchtigung</p> <p>Auf der affektierten Seite erfolgt keine Reaktion auf den Stimulus.</p>
	<p>Score 0: Tod</p>

3.2.8 Präparation der Gewebe

Am 14. Tag nach Reperfusion wurden die Tiere unter 5 %igem Isofluran bei einem Sauerstofffluss von 0,8 l/ min in letale Narkosetiefe versetzt und nach Erlöschen jeglicher Reflexe mit 50 ml PBS und anschließend 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) transkardial perfundiert.

Anschließend wurde das Gehirn entnommen, zur Fixation für 24 Stunden bei 4 °C in 4 %igem PFA gelagert und dann zur Dehydratation für weitere 24 Stunden in 30 %ige Sukroselösung transferiert.

48 Stunden nach Gehirnentnahme wurden die Gehirne mit dem Gehirnschneider in 2 mm dicke Scheiben geschnitten, in Cryomatrix (ShandonCryomatrix, Thermo Scientific) eingebettet und bei - 80 °C gekühlt. Schließlich wurden die Gehirnscheiben bei - 20 °C am Cryostat in 12 µm dünne Scheiben geschnitten, auf Objektträger gezogen und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

3.2.9 Infarktvolumentrie

3.2.9.1 Bestimmung der Infarktgrößen nach der TTC-Färbung

Die 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung ist eine günstige, schnelle Methode, um im Gehirnschnitt gesundes Gewebe von nekrotischem zu unterscheiden. Sie basiert auf einem Farbumschlag ins rötlich Violette, den Tetrazoliumchlorid erfährt, wenn es durch mitochondriale Dehydrogenasen des intakten Gehirngewebes reduziert wird. Die Infarktregionen bleiben aufgrund ausbleibender mitochondrialer Funktion farblos.

Zum Herstellen der 2 %igen Lösung wurden 1 g TTC in 50 ml PBS gelöst. Die Gehirnscheiben wurden dann in der abgedunkelten Lösung auf beiden Seiten für jeweils 5 min inkubiert und für weitere 10 min in 4 %ige PFA-Lösung transferiert, um einen Reaktionsstopp zu bewirken und das Gewebe zu fixieren.

Nach dem Einscannen der TTC-gefärbten Schnitte wurden die Infarktflächen mithilfe der ImageJ-Software (National Institutes of Health, USA) vermessen und die Infarktvolumina berechnet.

Es wurden verschiedene Parameter bestimmt: das direkte Infarktvolumen, das sich aus den Mittelwerten der direkt ausgemessenen Infarktareale multipliziert mit der Dicke der Hirnscheiben zusammensetzte, das indirekte Infarktvolumen zur Berücksichtigung des Gehirnödems und die Gehirnschwellung selbst als Differenz des direkten und indirekten Infarktvolumens.

Zur Berechnung des indirekten Infarkt Volumens wurde die Differenz der Flächen der kontralateralen Hemisphäre und der nicht-infarzierten ipsilateralen Hemisphäre gebildet und ebenfalls mit der Dicke der Hirnschnitte multipliziert (Swanson et al. 1990).

3.2.9.2 Bestimmung der Infarktgrößen nach der Fluoro-Jade-C-Färbung

Im Anschluss an die in Kapitel 3.2.8 beschriebene Gewebepräparation und -verarbeitung wurde ein Teil der Schnitte zur Bestimmung der Infarktgrößen mit Fluoro-Jade C gefärbt. Als Grundlage diente das Protokoll der Firma Histo-Chem Incorporated, USA (Schmued et al. 2005).

Fluoro-Jade C ist von den drei existierenden anionischen Farbstoffen auf Fluoreszin-Basis derjenige, dem die größte Affinität zu degenerierenden Neuronen und somit die höchste Auflösung zugesprochen wird (Schmued et al. 2005).

Angefärbt werden neben den Zellsomata auch distale Dendriten und Axone. An welche der durch den Zelltod entstandenen oder freigesetzten Substanzen Fluoro-Jade C bindet, ist noch immer unbekannt, sehr wahrscheinlich sind an dem Färbemechanismus Polyamine beteiligt.

Nachdem die Gehirnschnitte Raumtemperatur angenommen hatten, wurden sie für 5 min in Alkohollösung bestehend aus 20 ml 1 %igem Natriumhydroxid und 80 ml absolutem Ethanol inkubiert und im Anschluss für 2 min in 70 %iges Ethanol überführt.

Auf einen 2-minütigen Waschschrift in destilliertem Wasser folgte eine 10-minütige Inkubation der Schnitte in Kaliumpermanganat der Konzentration von 600 *Parts per million* (ppm). Dieser Schritt ist nicht nur bekannt dafür, Hintergrundfärbung zu reduzieren, sondern auch die Haltbarkeit der Fluoreszenzsignale zu steigern.

Nach einem weiteren Waschschrift von 2 min folgte die 60-minütige Inkubation in der Fluoro-Jade-C-Lösung der Konzentration von 1 ppm. Für diese wurden zunächst 10 mg Fluoro-Jade C in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. 1 ml dieser Bestands-Lösung wurde nun mit 99 ml 0,1 %iger Essigsäure vermischt. Für eine zusätzliche 4',6'-Diamidino-2-phenylindol-Färbung (DAPI-Färbung) wurden 99 ml der Fluoro-Jade-C-Färbelösung 1 ml 0,01 %iges DAPI zugefügt.

Nach dem Inkubationsschritt wurden die Objektträger dreimal in 1-minütigen Waschgängen in destilliertem Wasser (dH₂O) gespült.

Anschließend wurden sie 10 min bei 55 °C getrocknet und für weitere 2,5 min in Xylol gelegt. Eingedeckelt wurden die gefärbten Gewebe mit Roti ®-Histokitt II.

Zum Vergleich der Infarktgrößen wurden im Abstand von 2 mm Entfernung jeweils drei Fluoro-Jade C gefärbte Gehirnschnitte pro Tier herangezogen. Betrachtet wurden die Schnittebenen auf Höhe von 4,42 mm, 2,34 mm sowie 0,40 mm interaural.

Die Infarktflächen wurden mit AxioVision Rel. 4.8 vermessen und die Infarktvolumina berechnet, indem von zwei aufeinanderfolgenden Schnitten die Mittelwerte gebildet und mit ihrem Abstand multipliziert wurden, um im Anschluss die einzelnen Volumina zu einem Gesamtvolumen zu addieren (Encarnacion et al. 2011).

3.2.10 Immunhistochemie

Unabhängig von der Antikörperzusammensetzung der einzelnen Färbungen wurde stets derselbe Blockpuffer aus 5 %igem Eseserum, 0,25 %igem Triton-X-100 und *Tris-buffered saline* (TBS) verwendet.

Nachdem die Cryoschnitte Raumtemperatur angenommen hatten, wurden sie zweimal 5 min auf dem Schüttler in TBS gewaschen. In der Zwischenzeit wurde in einer zweiten Küvette Citratpuffer bei 800 W in der Mikrowelle bis an seinen Siedepunkt erhitzt (kleine Küvette: 3 min, große Küvette: 5 min), die Objektträger in diesen überführt und für weitere vier Minuten bei 80 W in der Mikrowelle erwärmt. Nach einer 30-minütigen Abkühlung wurden die Objektträger erneut zwei Waschschritten unterzogen, um in Anschluss die Gewebe mit 250 µl Blockpuffer pro Objektträger zu inkubieren.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 4 °C wurde der Primärantikörper aufgetragen.

Hierbei erwiesen sich folgende Mischverhältnisse der Antikörper zum Blockpuffer als optimal:

TLR4-Iba1-GFAP-Dreifachfärbung:

TLR4 (Spezies: Kaninchen) 1:1000

Ionized calcium-binding adapter molecule (Iba1) (Spezies: Maus) 1:1000

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Spezies: Huhn) 1: 1000

NeuN-Iba1-GFAP-Dreifachfärbung:

Neuron-specific nuclear antigen (NeuN) (Spezies: Maus) 1:500

Iba1 (Spezies: Kaninchen) 1:1000

GFAP (Spezies: Huhn) 1: 1000

TLR4-NeuN-Doppelfärbung:

TLR4 (Spezies: Kaninchen) 1:1000

NeuN (Spezies: Maus) 1:500

Zwischen der 24-stündigen Inkubationszeit bei 4 °C mit Primärantikörpern und dem Auftragen der Sekundärantikörper wurden die Objektträger dreimal nach bekanntem Schema gewaschen.

Die Sekundärantikörper wurden im Blockpuffer wie folgt verdünnt:

Dreifachfärbungen:

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

anti-rabbit Cy3 (Spezies: Esel) 1:250

anti-chicken Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (Spezies: Esel) 1:250

Doppelfärbungen:

anti-mouse Cy5 (Spezies: Esel) 1:250

anti-rabbit Cy3 (Spezies: Esel) 1:250

In diesem Fall erfolgte die Inkubation über eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Nach vier weiteren Waschschrritten wurden die Objektträger für 10 min auf dem Schüttler in DAPI der Konzentration von 2 µg/ ml inkubiert, nochmal in TBS gewaschen und im Anschluss mit ShandonCryomatrix eingedeckelt.

3.2.11 Digitalisierung der Schnitte

Alle gefärbten Schnitte wurden mit dem Axio Examiner Z1 mikroskopiert, mit der Axio Cam MRm aufgenommen und anschließend mit der Zen Version 1.0.0.0 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) weiterverarbeitet.

3.2.12 Zellzählung

Aus den Fluoro-Jade-C-gefärbten Gehirnschnitten ergab sich, dass der größte Unterschied innerhalb der Infarktgrößen auf Höhe von 4,42 mm interaural zu sehen war. Demnach wurden zur Zellzählung Schnitte dieser Ebene verwendet.

Gezählt wurden die Zellen mit der Zählfunktion des Adobe Photoshop CS4 Extended (Adobe Systems Incorporated, USA).

Für die Neuronenzählung wurden drei Kästen an definierten Stellen mit einer Höhe von 150 µm über die gesamte horizontale Ausdehnung NeuN-gefärbter Gehirnschnitte gezogen und getrennt nach Hemisphäre ausgezählt.

Einer der Kästen grenzte stets an den untersten Teil des Corpus Callosum, einer an den tiefsten Punkt der Lateralventrikel und einer an den kaudalen Teil der medialen präoptischen Fläche des Gehirnschnitts (s. Abbildung 6).

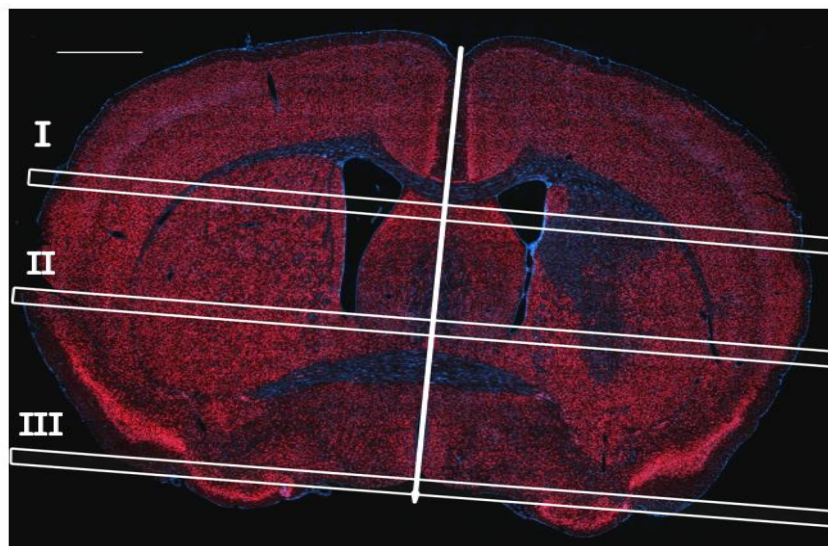


Abbildung 6: Zellquantifizierung in prädefinierten Auswertungs-Zonen in Form von

Darstellung der ausgezählten Kästen in NeuN-gefärbtem Schnitt auf der Höhe von 4,42 mm interaural:

- I Kasten unter dem Corpus Callosum
- II Kasten an unteren Lateralventrikel grenzend
- III Kasten im kaudalen Teil der medialen präoptischen Fläche

Für die Astrozytenzählung wurden die gleichen Kästen verwendet. In den Iba1-gefärbten Schnitten wurden alle aktivierten Makrophagen bzw. Mikroglia einer Hemisphäre gezählt.

Im Anschluss an das Zellenzählen wurden die ausgezählten Flächen mit Hilfe von AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) ausgemessen und so die Anzahl der Zellen auf einem Quadratmillimeter errechnet.

3.2.13 Statistische Auswertung

Auf Grundlage der Ergebnisse des Kurzzeitversuchs sowie der Pilotversuche wurden die Gruppengrößen für das Langzeitexperiment berechnet (s. Kapitel 4.1.5 und 4.2.2). Hierfür wurde die *Simple Interactive Statistical Analysis (SISA)-Binominal* verwendet (Uitenbroek 1997). Für die Berechnung wurde $\alpha = 0,05$ und $\beta = 0,8$ definiert.

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde GraphPad Prism 5 verwendet. Zum Vergleich der Infarktflächen, Zellzahlen, Neuroscores, Gewicht und Temperatur zwischen den beiden Behandlungsgruppen wurde der beidseitige Mann-Whitney-U-Test angewendet. In Bezug auf die Infarktgrößen und Zellzahlen wurden p-Werte kleiner oder gleich 0,05 als signifikant bezeichnet. Bei den wiederholten Messungen von Neuroscore, Gewicht und Temperatur galten nach Bonferroni-Adjustierung Werte unter $0,05/n$ (Anzahl der Messungen) als signifikant.

Zur Validierung der Zellzählmethode sowie zum Vergleich der Zellzahlen zwischen den beiden Hemisphären und der Dopplerwerte vor und nach MCAO wurde der einseitige Mann-Whitney-U-Test verwendet. Hier wurden p-Werte kleiner oder gleich 0,05 als signifikant, p-Werte unter 0,01 als sehr signifikant und p-Werte unter 0,001 als hoch signifikant gewertet.

Die Ergebnisse des Kurzzeitversuches wurden ebenso einseitig getestet. Bei allen weiteren Versuchen, auch dem Langzeitversuch, wurden zweiseitige Tests durchgeführt. Im Gegensatz zum Kurzzeitversuch war die Wirkung des Antikörpers im Langzeitversuch nicht bekannt und erforderte eine zweiseitige Testung. Das Überleben der beiden Behandlungsgruppen wurde mit dem Log-rank Test verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Kurzzeitversuch

Zur Bestimmung der Effektgrößen für die Poweranalyse sowie zur Gruppengrößenbestimmung wurde dem Langzeitversuch ein Vorversuch mit 48-stündiger Reperfusion vorangestellt. Der Versuchsaufbau war an die in Kapitel 1.6.3 erwähnten Experimente angelehnt und in Bezug auf die Okklusionszeit und die postoperative Versorgung auf ein Langzeitüberleben ausgerichtet:

In jeder Behandlungsgruppe befanden sich sieben männliche C57 BL/6N Mäuse im Alter von zehn Wochen. Unmittelbar vor der 30-minütigen MCAO wurden vier Tieren intraarteriell der TLR4-Antikörper, den anderen drei Tieren nur PBS appliziert.

Gewicht und Temperatur wurden unmittelbar vor Beginn der Operation sowie nach 24 und 48 Stunden gemessen und an jedem dieser Zeitpunkte sowohl der Bederson-Score als auch die *modified Neurological Score Scale* (mNSS) festgestellt. Die analgetische Nachbehandlung erfolgte in Form von Buprenorphingabe (s. 3.2.3.1).

Nach 48 Stunden wurden die Tiere in letale Narkosetiefe versetzt und mit 50 ml PBS transkardial perfundiert. Anschließend wurden die Gehirne entnommen, in 2 mm dicke Scheiben geschnitten und zur Bestimmung des Infarktolumens mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) gefärbt, eingescannt und Infarktgrößen sowie Gehirnschwellung bestimmt.

4.1.1 Physiologische Parameter

Als Parameter für den physiologischen Zustand der Tiere im Verlauf des Experiments wurden vor der Operation sowie nach 24 bzw. 48 Stunden Reperfusion das Körpergewicht und die oberflächliche Körpertemperatur gemessen.

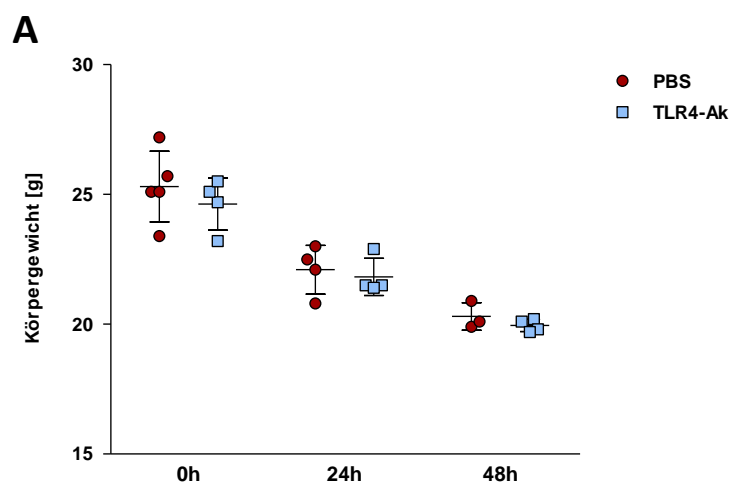
Im postoperativen Verlauf zeigte sich ein deutlicher Abfall des Körpergewichtes sowie der Körpertemperatur, der auf verminderte Nahrungsaufnahme und vorübergehende Immobilität infolge des invasiven Eingriffes zurückzuführen ist. Es konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen festgestellt werden.

4.1.1.1 Körpergewicht

Vor der Operation lag das durchschnittliche Körpergewicht in der Gruppe der behandelten Tiere bei $24,63 \text{ g} \pm 1,0 \text{ g}$ (Standardabweichung (SD)), das der Kontrollgruppe bei $25,30 \text{ g} \pm 1,37 \text{ g}$ (SD). Nach 48 Stunden verminderte sich das Gewicht im Durchschnitt um 19 % (TLR4-Antikörper (künftig: TLR4-Ak)) bzw. 20 % (PBS), sodass die behandelte Gruppe im Durchschnitt $19,95 \text{ g} \pm 0,24 \text{ g}$ und die unbehandelte Gruppe $20,30 \text{ g} \pm 0,53 \text{ g}$ wog (s. Abbildung 7A). Der p-Wert nach 48 Stunden war nicht signifikant ($p = 0,2378$; $n_{\text{PBS}} = 3$; $n_{\text{TLR4-Ak}} = 4$).

4.1.1.2 Körpertemperatur

Die durchschnittliche Körpertemperatur verminderte sich in einem geringeren Maßstab: in der Gruppe der behandelten Tiere sank die Temperatur innerhalb der ersten 48 Stunden um 4 % (von $31,65 \text{ °C} \pm 0,25 \text{ °C}$ auf $30,45 \text{ °C} \pm 0,34$), in der Kontrollgruppe verminderte sich die durchschnittliche Körpertemperatur um 7 % (von $32,52 \text{ °C} \pm 0,64 \text{ °C}$ auf $30,20 \text{ °C} \pm 0,53 \text{ °C}$) (s. Abbildung 7B). Auch hier zeigten sich nach 48 Stunden keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,4272$; $n_{\text{PBS}} = 3$; $n_{\text{TLR4-Ak}} = 4$).



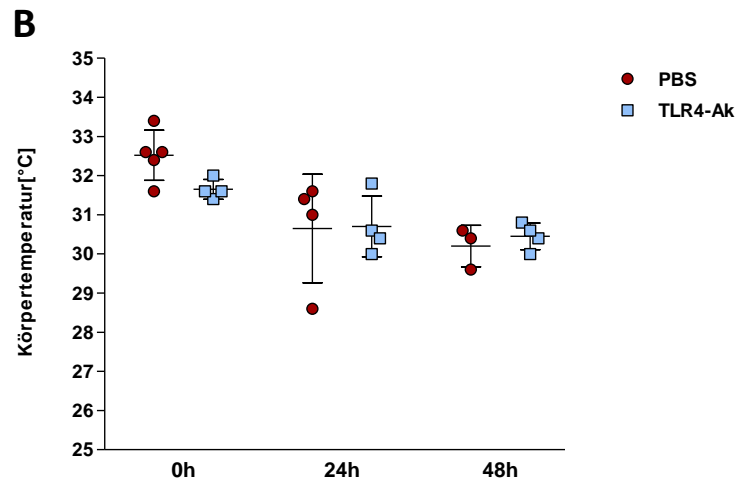


Abbildung 7: Gewicht- und Temperaturwerte im Kurzzeitversuch

Vor der 30-minütigen MCAO mit intraarterieller Applikation sowie 24 und 48 Stunden nach Reperfusionbeginn wurden Körpergewicht (A) und -temperatur (B) der TLR4-Antikörper-behandelten Tiere (TLR4-Ak) sowie der Kontrollgruppe (PBS) gemessen. Dargestellt werden die Einzelwerte als Scatter dot plots mit Mittelwerten und Standardabweichung. Zur Signifikanzbestimmung wurde der einseitige Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

4.1.2 Neuroscore

Die Tiere wurden vor der Operation sowie nach 24- und 48-stündiger Reperfusion mit Hilfe des Bederson-Scores bzw. der mNSS neurologisch getestet.

Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gab es erst nach 48 Stunden, wobei die Differenz der Behandlungsgruppe zur Kontrollgruppe in beiden Neuroscores keine Signifikanz erreichte (s. Abbildung 8), was auf die geringen Gruppengrößen zurückgeführt wurde. Die Tendenz der Ergebnisse aber entsprach den in der Arbeitsgruppe bereits zuvor bekannten Ergebnissen der Vorarbeit von Sarah Grünewald. Aus diesem Grund wurde auf ein Aufstocken der Tierzahlen verzichtet.

Im Bederson-Score betrug der Median der TLR4-Antikörper-behandelten Gruppe 0,50 (1. Quartil: 0,00; 3. Quartil: 1,00), der der Kontrollgruppe 1,00 (1. Quartil: 0,50; 3. Quartil: 4,00). Der p-Wert betrug $p = 0,1193$ (s. Abbildung 8A).

Der Median in der mNSS lag in der TLR4-Antikörper-behandelten Gruppe bei 13,50 (1. Quartil: 12,25; 3. Quartil: 14,00), in der Kontrollgruppe bei 9,00 (1. Quartil: 0,00; 3. Quartil: 12,00). Der p-Wert betrug $p = 0,0519$ (s. Abbildung 8B).

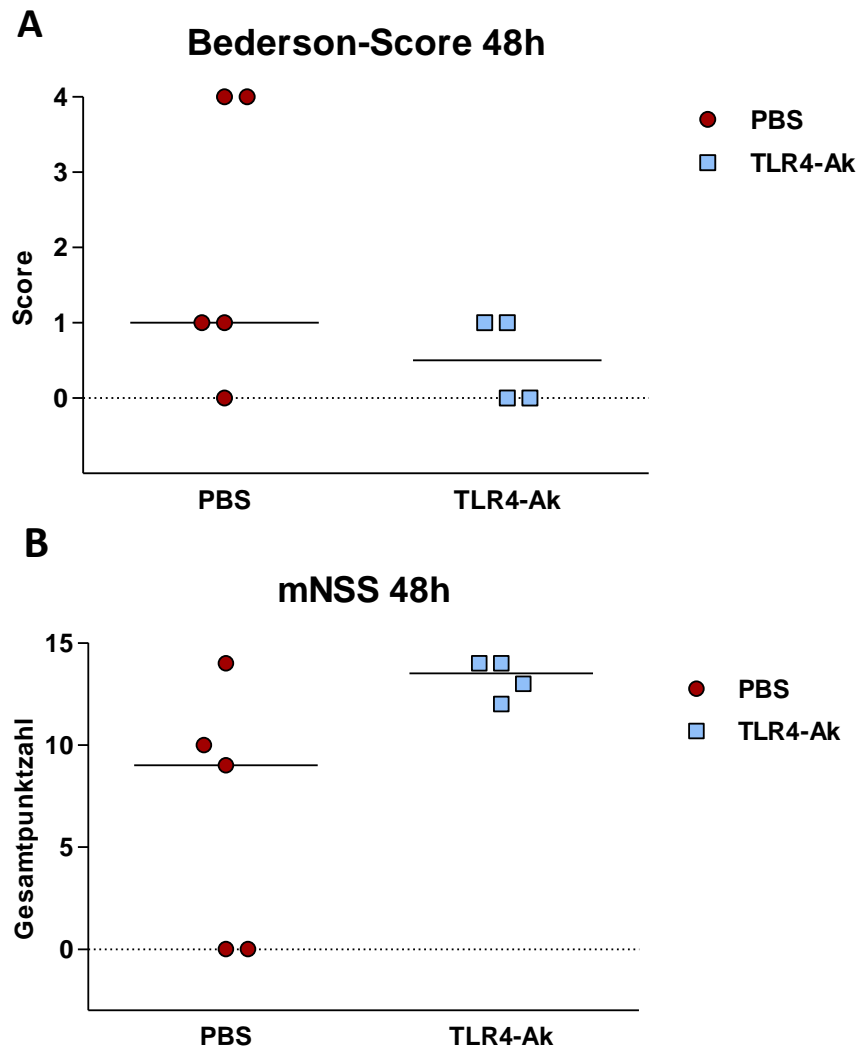


Abbildung 8: Neuroscores im Kurzzeitversuch

48 Stunden nach 30-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation konnten weder im Bederson-Score (A) noch im mNSS (B) signifikante Unterschiede zwischen den TLR4-Antikörper-behandelten Tieren (TLR4-Ak) ($n = 4$) und Tieren aus der Kontrollgruppe (PBS) ($n = 5$) festgestellt werden, wohl aber eine Tendenz zu besseren neurologischen Testergebnissen. Die Werte werden als Scatter dot plots mit Median dargestellt. Für die Signifikanzberechnung wurde der einseitige Mann-Whitney-U-Test verwendet.

4.1.3 Mortalität

Von den ursprünglich für den Versuch vorgesehenen 14 Tieren verstarben 5 Tiere bereits innerhalb der ersten sechs Stunden nach der Operation und wurden folglich nicht ausgewertet.

Demnach wurden in die Sterbeanalyse vier TLR4-Antikörper-behandelte Tiere und fünf Kontrolltiere eingeschlossen, von denen zwei im weiteren Verlauf verstarben.

In der Kontrollgruppe erreichten 60 % der Tiere den 2. Reperfusionstag, während in der Gruppe der TLR4-Antikörper-behandelten Tiere keines der Tiere verstarb. Insgesamt verstarben 22,2 % der Tiere im Versuchsverlauf (s. Abbildung 9). Zwischen den Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,1803$).

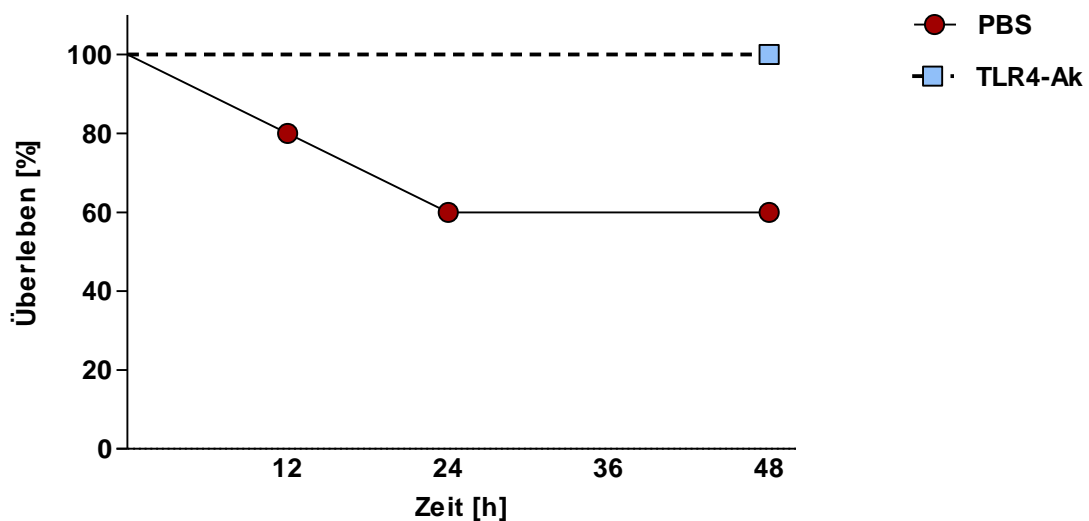


Abbildung 9: Überleben im Kurzzeitversuch

48 Stunden nach 30-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation konnte kein signifikanter Unterschied zwischen TLR4-Antikörper-behandelten Tieren (**TLR4-Ak**) ($n = 4$) und Tieren der Kontrollgruppe (**PBS**) ($n = 3$) festgestellt werden. Dargestellt werden die Werte als Kaplan-Meier-Kurve. Ermittelt wurde der p -Wert mit dem Log-rank-Test.

4.1.4 Infarktgrößen

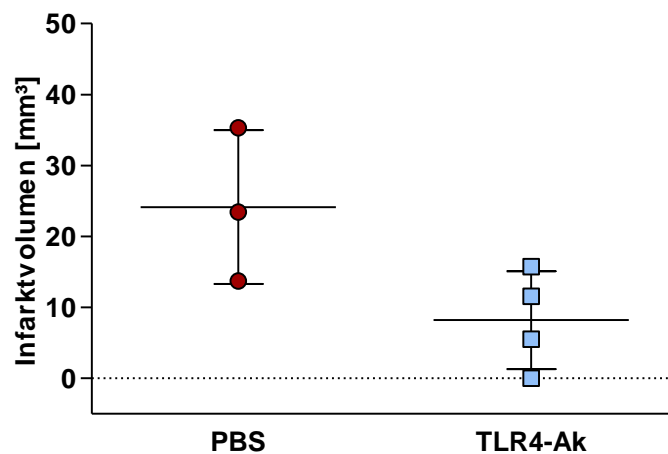
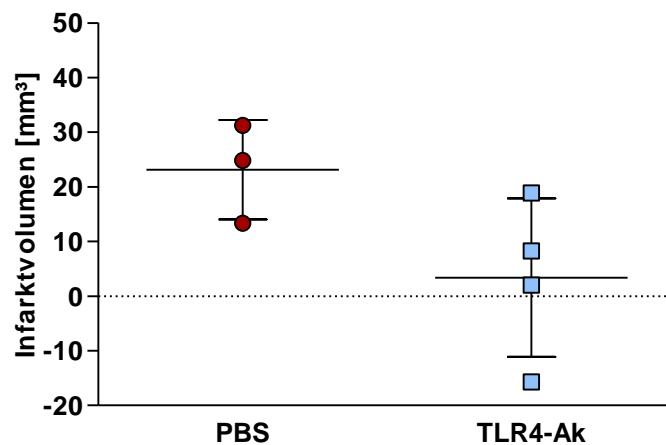
Nach 30-minütiger MCAO und 48-stündiger Reperfusion wurden die Gehirne der Tiere entnommen und für den Vergleich der Infarktvolumina wie in Kapitel 3.2.9.1 beschrieben mit TTC gefärbt (s. Abbildung 11).

Bestimmt wurden das direkte und indirekte Infarktvolumen sowie die Gehirnschwellung.

Das mittlere direkte Infarktvolumen der TLR4-Antikörper-behandelten Tiere ($n = 4$) lag mit $8,21 \text{ mm}^3$ mit einer Standardabweichung von $\pm 6,90 \text{ mm}^3$ deutlich unter dem der Kontrollgruppe ($n = 3$), die im Durchschnitt ein direktes Schlaganfallvolumen von $24,15 \text{ mm}^3 \pm 10,80 \text{ mm}^3$ aufwies (s. Abbildung 10A).

Ähnliche Tendenzen zeigten sich im Vergleich der indirekten Schlaganfallvolumina: Das mittlere Infarktvolumen der behandelten Tiere belief sich auf $3,37 \text{ mm}^3 \pm 14,50 \text{ mm}^3$, während in den Gehirnschnitten der Kontrollgruppe im Durchschnitt Infarktgrößen von $23,10 \text{ mm}^3 \pm 9,08 \text{ mm}^3$ gemessen wurden (s. Abbildung 10B). Ein signifikanter Unterschied wurde im Mann-Whitney-U-Test sowohl in Bezug auf das direkte als auch auf das indirekte Infarktvolumen nur sehr knapp nicht erreicht ($p_{\text{direkt}} = 0,0571$; $p_{\text{indirekt}} = 0,0571$).

Im Vergleich der Gehirnschwellung ließen sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen detektieren (s. Abbildung 10C). Das durchschnittliche Gehirnödem der behandelten Tiere belief sich auf $4,84 \text{ mm}^3 \pm 9,35 \text{ mm}^3$, das der Kontrollgruppe auf $1,02 \text{ mm}^3 \pm 2,78 \text{ mm}^3$. Der p-Wert betrug im Mann-Whitney-U-Test $p = 0,5$.

A**Direktes Infarktvolumen****B****Indirektes Infarktvolumen**

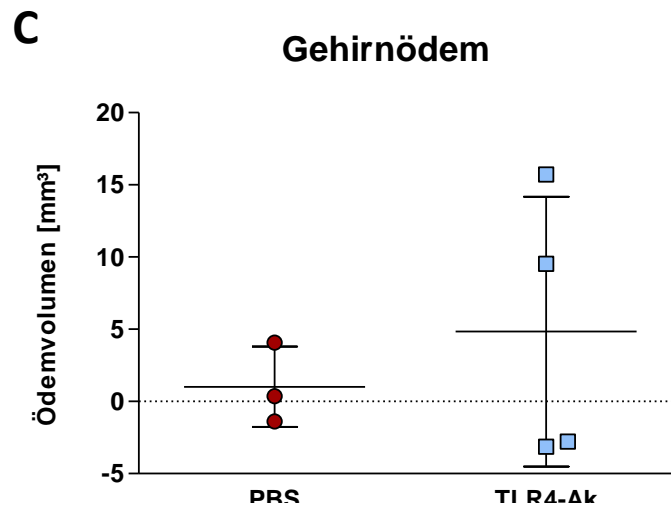


Abbildung 10: Infarktmetrie im Kurzzeitversuch

(A) Das direkte Infarktmetrie wurde direkt in den TTC-gefärbten Gehirnschnitten vermessen.

(B) Das indirekte Infarktmetrie ist die Differenz aus dem Volumen der kontralateralen Hemisphäre und dem der nicht-infarzierten ipsilateralen Hemisphäre.

(C) Die Gehirnschwellung lässt sich aus der Differenz des direkten und indirekten Infarktmetriens ermitteln.

Nach 30-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation und 48-stündiger Reperfusion konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden, auch wenn Tendenzen zu kleineren Infarktmetriens in der TLR4-Antikörper-behandelten Gruppe (**TLR4-Ak**) im Vergleich zur Kontrollgruppe (**PBS**) zu erkennen waren (**A** und **B**).

Alle Werte wurden als Scatter dot plots mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Als Signifikanztest wurde der einseitige Mann-Whitney-U-Test verwendet.

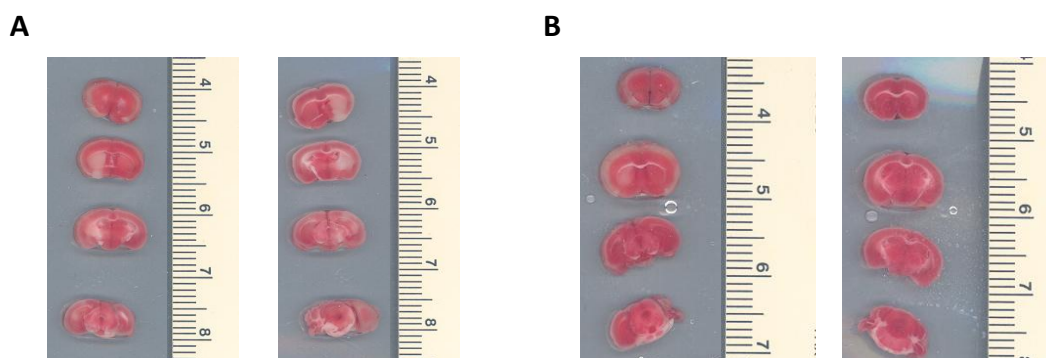


Abbildung 11: TTC-Färbung

Nach 30-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation und 48-stündiger Reperfusion wurden die Gehirne entnommen und TTC-gefärbt.

(A) unbehandeltes Gehirn; links: Ansicht von rostral, rechts: Ansicht von okzipital

(B) TLR4-Antikörper-behandeltes Gehirn; links: Ansicht von rostral, rechts: Ansicht von okzipital

4.1.5 Gruppengrößenberechnung

Auf der Grundlage des Kurzzeitversuchs wurde anhand von Mittelwert und Standardabweichung des direkten Infarkt volumens die Gruppengrößenberechnung für den eigentlichen Versuch durchgeführt. Nach zweiseitiger Testung über SISA-Binomial (s. Kapitel 3.2.13) bei einer *allocation ratio* von 1,0, einer Power von $1-\beta = 0,8$ und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ wurden folgende Mindestgruppengrößen für den Hauptversuch berechnet: $n_{\text{TLR4-Ak}} = 5$ sowie $n_{\text{PBS}} = 5$. Unter Berücksichtigung der Mortalitätsrate ergab sich damit eine Gruppengröße von $n = 20$ (s. Kapitel 4.2.2).

4.2 Untersuchung der postischämischen Mortalität

Der in Kapitel 4.1 beschriebene Kurzzeitversuch ergab, dass sich die bereits durch Sarah Grünewald gezeigten Effekte einer TLR4-Inhibition nach 48 Stunden reproduzieren lassen. Nach gleichem Versuchsaufbau (s. Kapitel 4.1) wurde nun ein siebentägiger Pilotversuch durchgeführt. Von den ursprünglichen acht Tieren verstarb eines direkt während der OP, zwei weitere mussten aufgrund unzureichenden Dopplerabfalls aus der Auswertung ausgeschlossen werden.

Von den fünf übrigen Tieren verstarben alle innerhalb der ersten fünf Tage ($n_{\text{TLR4-Ak}} = 3$, $n_{\text{PBS}} = 2$) (s. Abbildung 12). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Überleben zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,1824$).

Diese Mortalität konnte anhand der Sterberate des Kurzzeitversuchs (22,2 %) nicht vorhergesehen werden.

Für eine Optimierung der Versuchsdurchführung im Sinne der *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* (STAIR)-Kriterien (Liu et al. 2009) wurden weitere Pilotversuche zu Reduktion der Mortalität nötig. Aufgrund der Vermutung, die Sterbeproblematik könne auf zu große Infarkte oder postoperative Infekte zurückzuführen sein, unterschieden sich die einzelnen Versuche geringfügig in der Okklusionszeit und in der postoperativen Versorgung.

Mortalitätsvergleich TLR4-Ak vs PBS bei 30 min MCAO/7d Reperfusion

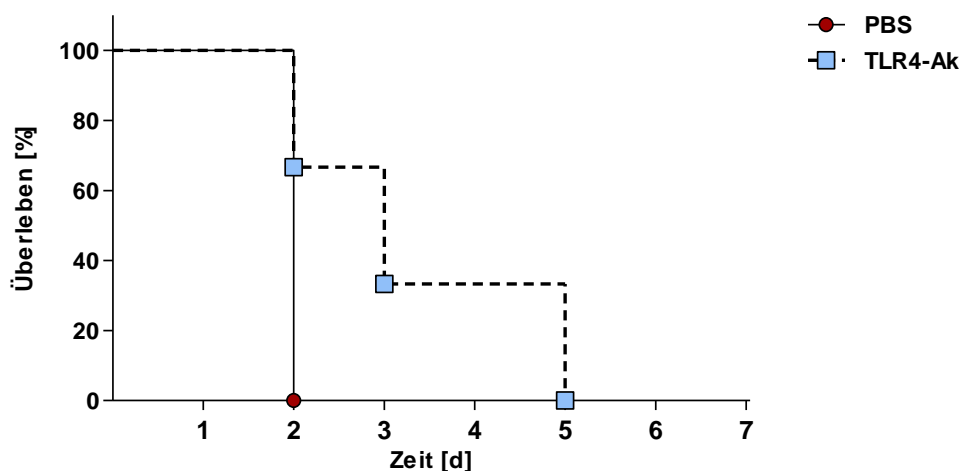


Abbildung 12: Mortalitätsvergleich TLR4-Ak vs PBS bei 30-minütiger MCAO und 7-tägiger Reperfusion

Nach 30-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation und 7-tägiger Reperfusion wurden die Überlebenskurven der TLR4-Antikörper-behandelten Tiere (TLR4-Ak) mit denen der Kontrollgruppe (PBS) verglichen.

Dargestellt wird das prozentuale Überleben im zeitlichen Verlauf: Die Abbildung entspricht einer Kaplan-Meier-Kurve, für den statistischen Vergleich der Kurven wurde der Log-rank-Test verwendet.

4.2.1 Okklusionszeit und postoperative Käfigtemperatur

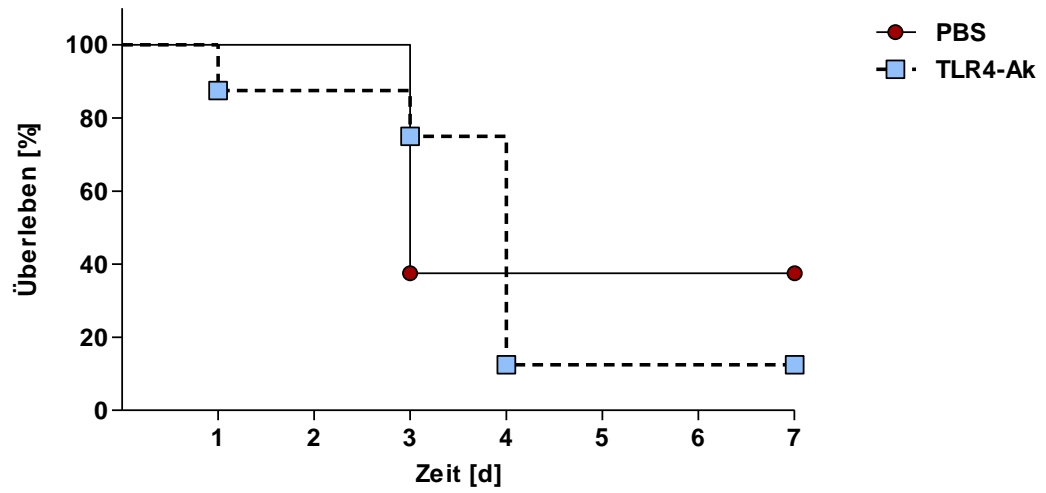
Da die Dauer der MCA-Okklusion sowie eine Temperaturregulationsstörung der Mäuse infolge der kurzzeitigen postoperativen Immobilität und verminderten Nahrungsaufnahme als mögliche mortalitätsbestimmende Einflussfaktoren diskutiert wurden, wurde im Folgenden die MCAO-Dauer von 30 auf 15 Minuten reduziert und eine modifizierte postoperative Käfigtemperatur eingeführt (s. Kapitel 3.2.3.3). Zu Beginn befanden sich in jeder Gruppe acht Tiere. Insgesamt 25 % der Tiere lebten bis zum siebten Reperfusionstag. Davon stammten drei aus der Kontrollgruppe. Eines war mit dem TLR4-Antikörper behandelt.

Da bei 15-minütiger Okklusionszeit in den TTC-gefärbten Gehirnen ausreichend große Infarkte zu sehen waren (s. Abbildung 13C), wurden alle weiteren Versuche mit dieser nach der Literatur bislang selten verwendeten Okklusionszeit (Chen et al. 2015; Krey et al. 2015) fortgeführt.

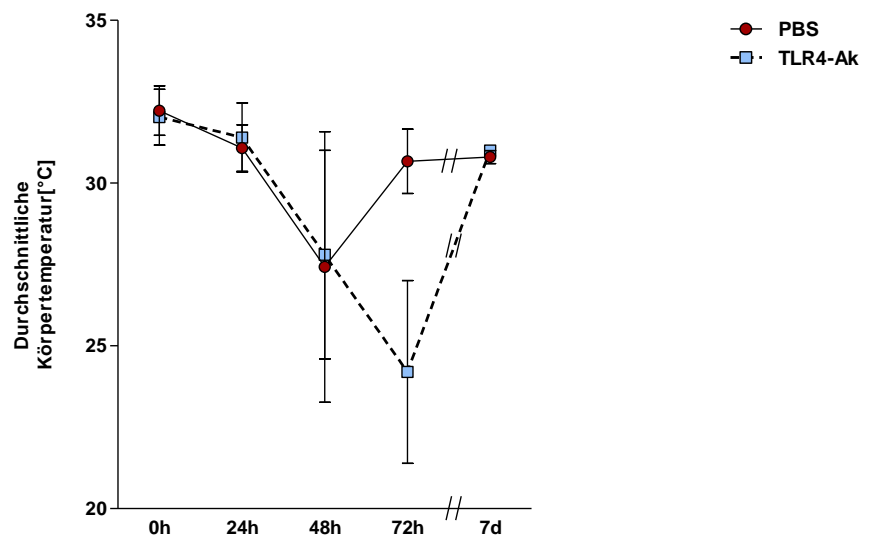
Mortalitätsvergleich TLR4-Ak vs PBS

bei 15 min MCAO/7d Reperfusion und modifizierter postoperativer Käfigtemperatur

A



B



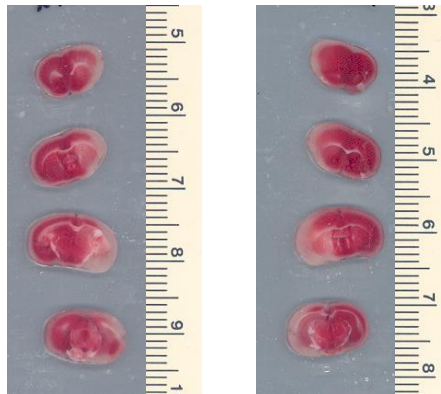
C

Abbildung 13: Pilotversuch mit veränderter Okklusionsdauer und modifizierter postoperativer Käfigtemperatur

Nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation und 7-tägiger Reperfusion wurden die Überlebenskurven der mit dem TLR4-Antikörper behandelten Tiere (**TLR4-Ak**) mit denen der Kontrollgruppe (**PBS**) verglichen. Ihr Körpergewicht sowie ihre Körpertemperatur wurde nach 24h, 48h, 72 h und am 7. Reperfusionstag gemessen.

(A) Prozentuales Überleben im zeitlichen Verlauf: Die Abbildung entspricht einer Kaplan-Meier-Kurve, für den statistischen Vergleich der Kurven wurde der Log-rank-Test verwendet.

(B) Zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Körpertemperatur: Dargestellt werden die Werte als Mittelwerte mit Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels beidseitigem Mann-Whitney-U-Test.

(C) TTC-gefärbtes Gehirn (unbehandelt) nach 15-minütiger MCAO und 24-stündiger Reperfusion. Links: Ansicht von rostral, rechts: Ansicht von okzipital. Dieser Infarkt zählt unter den Infarkten nach 15-minütiger MCAO zu den größten.

4.2.2 Intensivierte postoperative Versorgung

Als weiterer Faktor mit potenziellem Einfluss auf die postischämische Mortalität kamen postischämische Infektionen infrage. Mit der Ergänzung des bisherigen Versuchsaufbaus um die Gabe von Ceftriaxon als Antibiotikum (s. Kapitel 3.2.3.2) wurde die postoperative Behandlung der Tiere intensiviert. Zusätzlich wurde die systemische Buprenorphin-Gabe durch Lokalanalgesie in Form von Lidocaingel (s. Kapitel 3.2.3.1) ersetzt. Im Vergleich zu den Vorresultaten ergab sich durch dieses Setting eine deutliche Steigerung des Überlebens. Zu Beginn befanden sich in der Antikörper-behandelten Gruppe vier Tiere, in der Kontrollgruppe fünf. Nach siebentägiger Reperfusion lebten noch 33,3 % der Tiere (drei von neun).

Auf dieser Grundlage erfolgte die endgültige Berechnung der Gruppengrößen für den Langzeitversuch, da in der Berechnung auf Grundlage des Kurzzeitversuchs kein Verlust an Tieren berücksichtigt wurde (s. Kapitel 4.1.5). Die zu erstrebende Gruppengröße nach zwei Wochen von mindestens $n = 5$ je Gruppe (s. Kapitel 4.1.5) bei einer zu erwartenden Gesamtmortalität von etwa 33 % forderte eine Ausgangsgruppengröße von je $n = 15$. Da es sich bei dieser Mortalität um den Durchschnitt beider Gruppen handelte und alle vorigen Versuche leichte, nicht signifikante Unterschiede im Überleben zwischen den beiden Gruppen zeigten (s. Abbildung 13A, Abbildung 14A und Abbildung 15), wurde auch dies in der Kalkulation mit einer Aufstockung der Gruppen um je $n = 5$ berücksichtigt. Somit ergab sich für den Hauptversuch jeweils eine Gruppengröße von $n = 20$.

Unabhängig vom Versuchsaufbau war es auffällig, dass der Großteil der Tiere im Zeitraum zwischen 72 und 96 Stunden nach Reperfusionbeginn verstarb. Dies ließ sich meist im Vorfeld durch einen Abfall der Temperatur- und Gewichtskurven sowie in einer Steigerung des neurologischen Defizits erkennen (s. Abbildung 13A, B). Zwischen den Gruppen innerhalb eines Versuchs gab es keine signifikanten Unterschiede im Überleben (s. Abbildung 13A: $p_{\text{Käfigtemperatur und Okklusionszeit}} = 0,7826$; $n_{\text{TLR4-Ak}} = 8$, $n_{\text{PBS}} = 8$, und Abbildung 14A: $p_{\text{intensivierte postoperative Versorgung}} = 0,3609$; $n_{\text{TLR4-Ak}} = 4$, $n_{\text{PBS}} = 5$).

Mortalitätsvergleich TLR4-Ak vs PBS

bei 15 min MCAO/7d Reperfusion und intensivierter postoperativer Versorgung

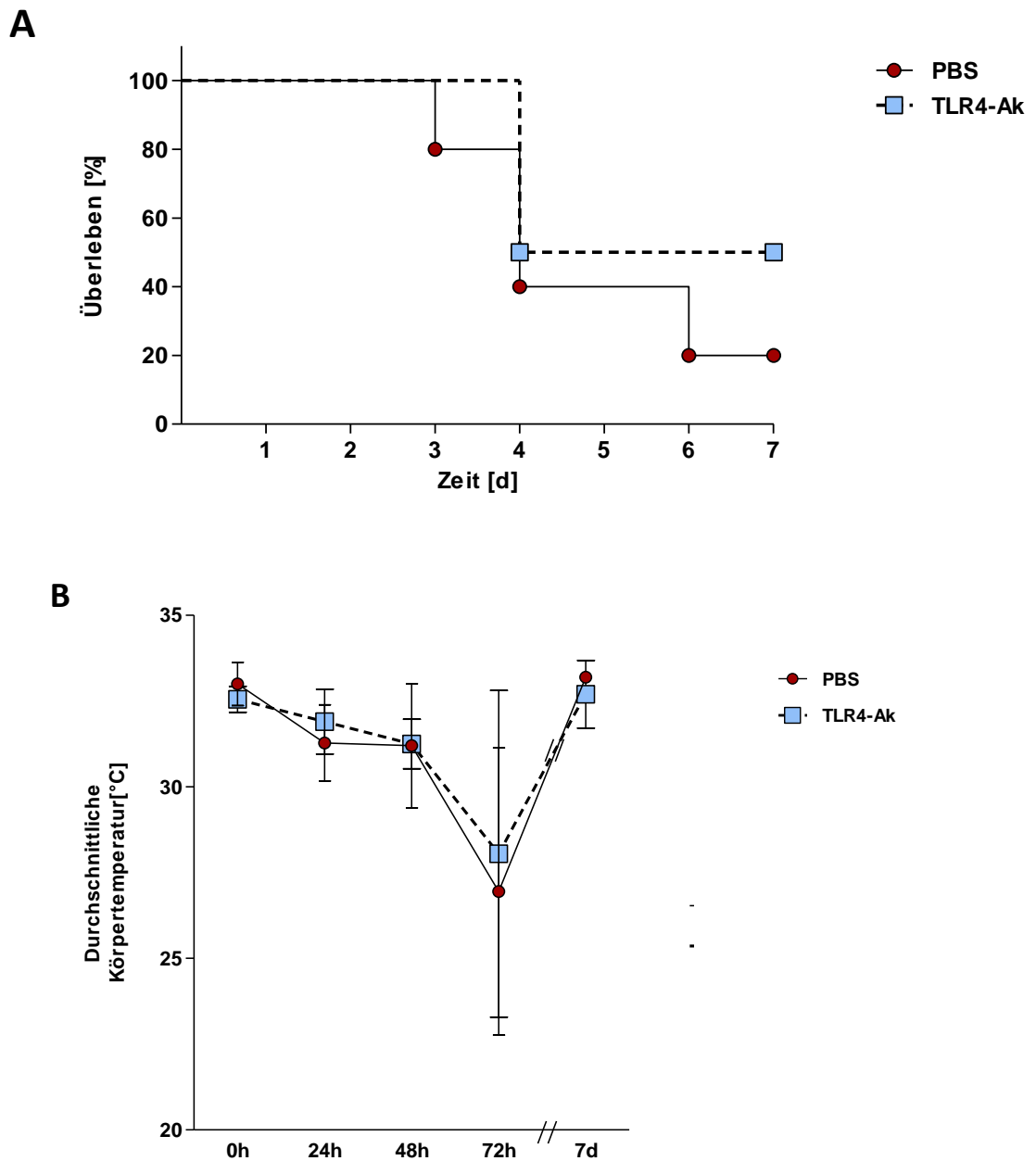


Abbildung 14: Pilotversuch mit intensivierter postoperativer Versorgung

Nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation und 7-tägiger Reperfusion wurden die Überlebenskurven der TLR4-Antikörper-behandelten Tiere (**TLR4-Ak**) mit denen der Kontrollgruppe (**PBS**) verglichen. Ihr Körpergewicht sowie ihre Körpertemperatur wurde nach 24h, 48h, 72 h und am 7. Reperfusionstag gemessen.

(A) Prozentuales Überleben im zeitlichen Verlauf: Die Abbildung entspricht einer Kaplan-Meier-Kurve, für den statistischen Vergleich der Kurven wurde der Log-rank-Test verwendet.

(B) Zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Körpertemperatur: Dargestellt werden die Werte als Mittelwerte mit Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels beidseitigem Mann-Whitney-U-Test.

4.2.3 Erfahrung des Operateurs

Um auszuschließen, dass die MCAO nur dann für Langzeitversuche vorgesehen werden kann, wenn sie von erfahrenen Operateuren durchgeführt wird, wurde ein weiterer Pilotversuch mit dem Versuchsaufbau der intensivierten postoperativen Versorgung durchgeführt und als erfahrene Operateurin Bozena Czech-Zechmeister eingesetzt, die zum Zeitpunkt der Experimente bereits seit sieben Jahren Mäuse nach dem MCAO-Modell operierte. Im Überleben der Tiere nach der ersten Reperfusionswochen konnte kein Unterschied zwischen ihren und meinen Resultaten festgestellt werden (s. Abbildung 14A und Abbildung 15): Auch hier waren die Unterschiede im Überleben nicht signifikant ($p = 0,2645$). Nach sieben Tagen lebten noch vier von zehn Tieren ($n_{\text{TLR4-Ak}} = 5$, $n_{\text{PBS}} = 5$) (s. Abbildung 15).

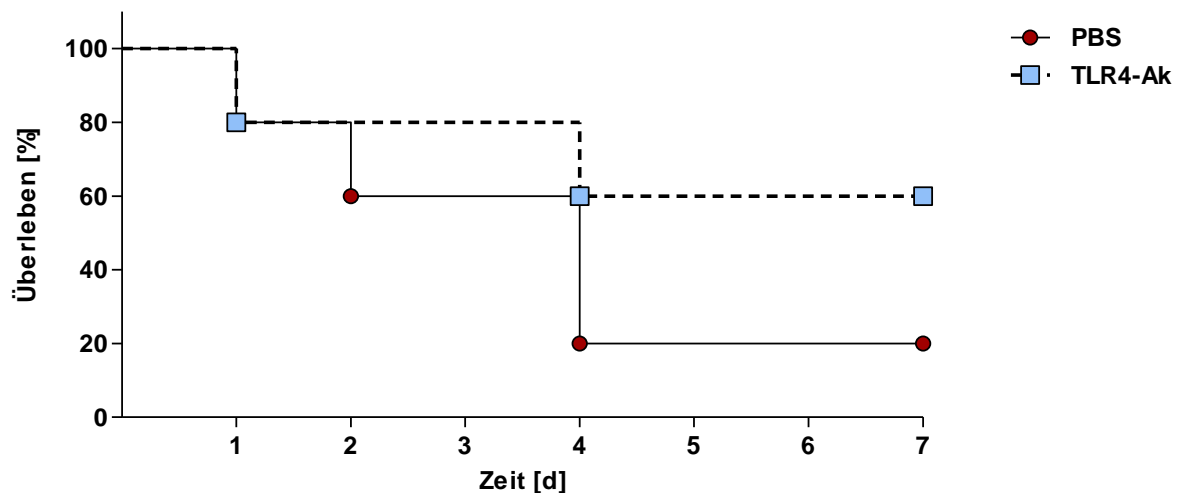


Abbildung 15: Pilotversuch zum Einfluss der Erfahrung des Operateurs auf das Überleben

Nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation durch eine erfahrene Operateurin und 7-tägiger Reperfusion wurden die Überlebenskurven der TLR4-Antikörper-behandelten Tiere (**TLR4-Ak**) mit denen der Kontrollgruppe (**PBS**) verglichen.

Dargestellt wird das prozentuale Überleben im zeitlichen Verlauf als Kaplan-Meier-Kurve, für den statistischen Vergleich der Kurven wurde der Log-rank-Test verwendet.

4.3 Langzeitversuch

Der eigentliche Langzeitversuch wurde auf der Grundlage des in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Pilotversuchs mit der intensivierten postoperativen Versorgung durchgeführt (s. Kapitel 4.2.2). Hieraus ergab sich folgender Versuchsaufbau:

40 männliche C57 BL/6N-Mäuse der Janvier Labs im Alter von elf bis zwölf Wochen wurden zufällig einer der beiden Behandlungsgruppen zugeteilt und nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens zwei Wochen einer 15-minütigen *Middle cerebral artery occlusion* unterzogen.

Vor dieser mikrochirurgischen Schlaganfallinduktion wurde der einen Hälfte der Tiere der Antikörper zur TLR4-Blockade, der anderen Hälfte Vehicle-Lösung in Form von PBS intraarteriell verabreicht.

Gewicht- und Temperaturmessungen sowie neurologische Tests wurden unmittelbar vor Operationsbeginn und nach 24, 48 und 72 Stunden sowie nach 7 und 14 Tagen durchgeführt.

Eine analgetische Nachbehandlung erfolgte in Form von Lidocain-Gel. Um einer Unterkühlung entgegenzuwirken, erfuhren die Tiere in den ersten 72 Stunden *post reperfusionem* eine Optimierung der postoperativen Käfigtemperatur wie in Kapitel 3.2.3.3 beschrieben. Als Infektionsprophylaxe wurde innerhalb der ersten 48 Stunden Ceftriaxon verabreicht (s. Kapitel 3.2.3.3).

Nach 14 Tagen Reperfusion wurden die Tiere perfundiert und die Gehirne zur weiteren Untersuchung entnommen. Diese beinhaltete Infarktmetrie mit Fluoro-Jade-C-gefärbten Cryoschnitten und immunhistochemische Färbungen mit anschließender Zellquantifizierung von NeuN-, Iba1- und GFAP-positiven Zellen.

Abbildung 16 gibt einen Überblick über den Ablauf des Langzeitversuchs.

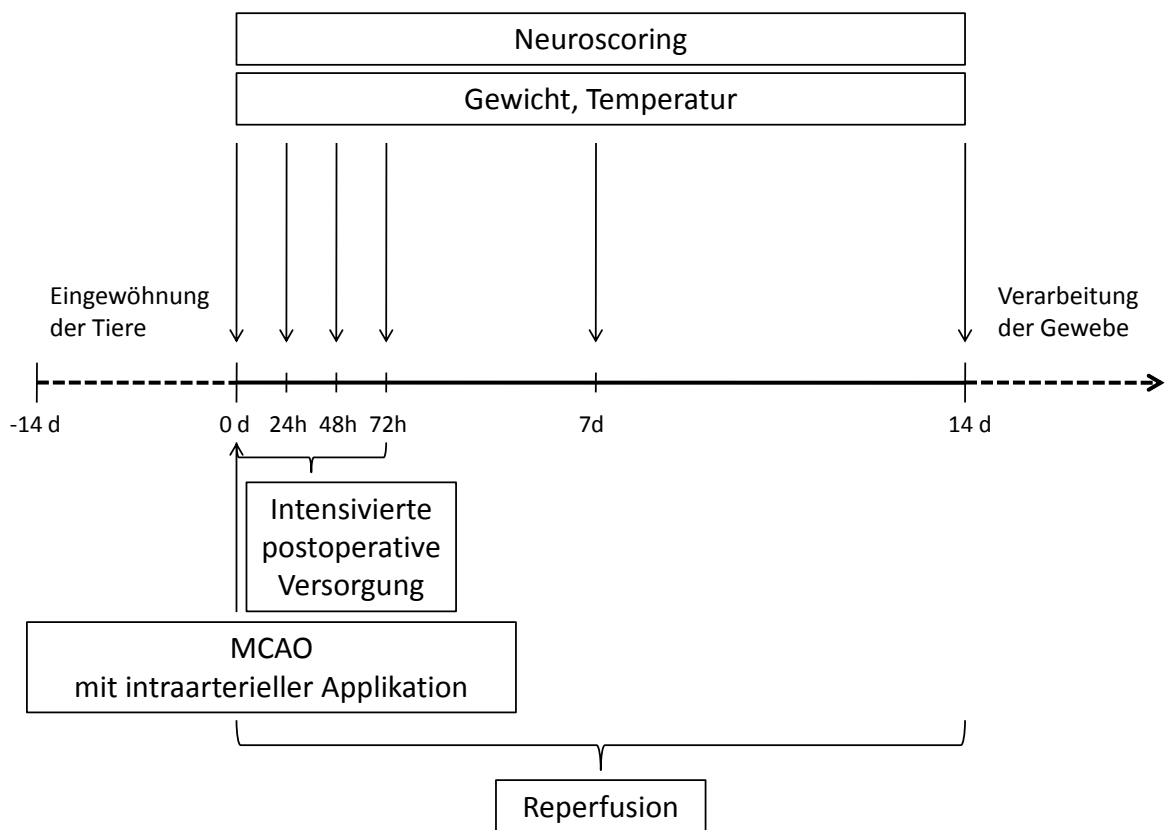


Abbildung 16: Versuchsablauf des Langzeitversuchs

Aufgrund der in Kapitel 3.2.5 definierten Ausschlusskriterien wurden von den ursprünglich veranschlagten 40 Tieren 5 von jeglicher Auswertung ausgeschlossen. Zwei der Tiere gehörten zur Kontrollgruppe, drei erhielten den TLR4-Antikörper. Gründe für den Ausschluss waren ein ungenügender Dopplerabfall und Todesfälle unmittelbar nach der Operation aufgrund von Komplikationen.

Die verbliebenen 35 Tiere, davon 18 TLR4-Antikörper behandelt (zukünftig auch einfach: behandelt) und 17 TLR4-Antikörper unbehandelt (zukünftig auch einfach: unbehandelt), wurden in Hinblick auf physiologische Parameter wie Gewicht und Temperatur sowie die Neuroscores ausgewertet.

In Bezug auf die Infarktmetrie und Zellquantifizierung konnten nur die Tiere, die bis zum 14. Tag *post reperfusionem* überlebten, ausgewertet werden. Hierbei handelte es sich um fünf unbehandelte und sechs behandelte Tiere.

4.3.1 Physiologische Parameter

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Experiments wurden die Temperatur und das Gewicht der Tiere als physiologische Parameter gemessen. Sie dienten u.a. als Hinweis für eine vorliegende Sepsis, die bei Mäusen klinisch nur schwer erkennbar, aber eine gefürchtete Komplikation des Infarktes ist (Prass et al. 2003; Meisel et al. 2004). Auch sollte durch die Erhebung dieser Parameter ausgeschlossen werden, dass mögliche Unterschiede im Infarktoutcome durch den physiologischen Zustand der Tiere beeinflusst wurden.

4.3.1.1 Körpergewicht

Zu Beginn des Experiments betrug das durchschnittliche Körpergewicht in der Kontrollgruppe $25,23 \text{ g} \pm 1,82 \text{ g}$ (SD) ($n = 17$), das der behandelten Gruppe $24,58 \text{ g} \pm 2,05 \text{ g}$ ($n = 18$). Auch wenn im Verlauf des Experiments das durchschnittliche Gewicht stark abfiel, normalisierte es sich gegen Ende des Experiments wieder. Nach 14 Tagen wogen unbehandelte Tiere im Durchschnitt $24,42 \text{ g} \pm 1,65 \text{ g}$ ($n = 5$). Bei den behandelten Tieren ($n = 6$) lag das durchschnittliche Körpergewicht bei $23,87 \text{ g} \pm 1,30 \text{ g}$ (s. Abbildung 17A). Der stärkste Gewichtsverlust im Vergleich zum Vortag fand zwischen 24 und 48 Stunden nach Reperfusionbeginn statt. Das Gewicht der Kontrollgruppe reduzierte sich im Durchschnitt auf 90 % des Gewichts des Vortages, in der behandelten Gruppe auf 91 %. Der größte Unterschied zwischen den Gruppen zeigte sich nach 24 Stunden. Er war allerdings nicht signifikant ($p = 0,1894$).

4.3.1.2 Körpertemperatur

Die durchschnittliche oberflächliche Körpertemperatur der Kontrollgruppe betrug unmittelbar vor dem operativen Eingriff $32,99 \text{ °C} \pm 0,60 \text{ °C}$ (SD), das der behandelten Tiere $32,60 \text{ °C} \pm 0,63 \text{ °C}$. In Korrelation zum Verlauf der Gewichtskurve fiel innerhalb der ersten Tage die durchschnittliche Körpertemperatur deutlich ab. Allerdings fand der stärkste Abfall im Vergleich zum Gewichtsverlust mit einer Verzögerung von 24 Stunden statt und war demnach zwischen 48 und 72 Stunden nach Reperfusionbeginn zu beobachten. In der Kontrollgruppe verringerte sich das Körpergewicht der Tiere in diesem Zeitraum im Schnitt auf 90 % des vorigen Wertes, in der Gruppe der behandelten Tiere auf 92 %. Analog zum Gewicht normalisierte sich die Körpertemperatur im Durchschnitt auf die Ausgangswerte (s. Abbildung 17B).

Im Durchschnitt hatten die unbehandelten Tiere 14 Tage nach MCAO eine Körpertemperatur von $31,76\text{ °C} \pm 1,20\text{ °C}$, die behandelten Tiere $31,90\text{ °C} \pm 0,86\text{ °C}$.

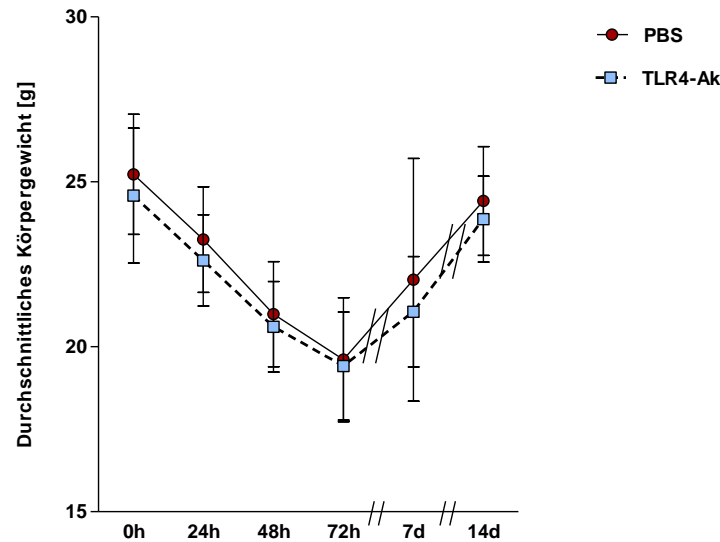
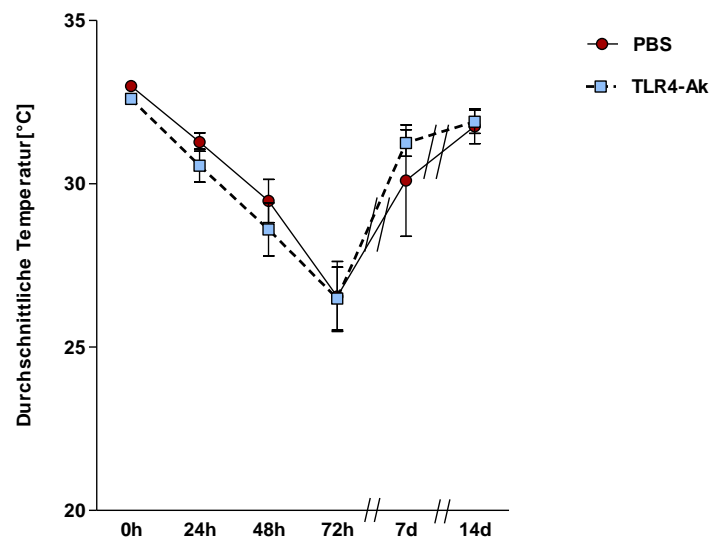
A**B**

Abbildung 17: Gewicht und Temperatur im Langzeitversuch

Vor der 15-minütigen MCAO mit intraarterieller Applikation und 14-tägiger Reperfusion, 24, 48 und 72 h sowie 7 und 14 d nach Reperfusionbeginn wurden Körpergewicht (**A**) und -temperatur (**B**) der Tiere gemessen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Antikörperbehandelten-Tieren (**TLR4-Ak**) und den Tieren der Kontrollgruppe (**PBS**) festgestellt werden.

Dargestellt werden die Einzelwerte als Mittelwerte mit Standardabweichung. Als Signifikanztest wurde der beidseitige Mann-Whitney-U-Test verwendet. Aufgrund postoperativer Mortalität variieren die Gruppengrößen der Behandlungsgruppen zu den verschiedenen Messzeitpunkten:

0h: n(PBS) = 17, n(TLR4-Ak) = 18

Weder in Bezug auf den Gewichtsverlauf noch auf die Temperaturentwicklung konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Der größte Unterschied zwischen den Gruppen zeigte sich nach 24 Stunden *post reperfusionem* ($p = 0,2191$).

Dass in die Auswertung auch die Tiere eingeschlossen wurden, die im Laufe des Experiments verstarben (s. Kapitel 4.3.3), spiegelt sich auch in den Grafiken wider: Bis zu 72 Stunden nach Reperfusion gab es sowohl in Bezug auf das durchschnittliche Körpergewicht als auch auf die durchschnittliche, oberflächlich gemessene Körpertemperatur einen deutlichen Abfall, der sich ebenso in der Gruppengröße widerspiegelt (s. Abbildung 17A,B).

Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, kündigte sich das Versterben eines Tieres durch eine abfallende Körpertemperatur an. Die Kurven des Körpergewichts und der Körpertemperatur korrelieren demnach mit der Mortalitätskurve (s. Kapitel 4.3.3).

4.3.2 Neuroscore

Zur Feststellung von möglichen Einflüssen einer TLR4-Antikörperbehandlung auf das neurologische Verhalten wurden die Tiere zu Beginn des Experiments sowie 24, 48 und 72 Stunden und 7 sowie 14 Tage nach Reperfusionbeginn mit zwei verschiedenen Tests neurologisch getestet. Hierfür wurden der Bederson-Score und die mNSS verwendet.

Zu keinem Zeitpunkt ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen. Dies traf auf beide Neuroscores zu.

Im Bederson-Score wies die Gruppe der behandelten Tiere nach 24-stündiger Reperfusion größere neurologische Defizite als die Kontrollgruppe auf, die sich allerdings nicht signifikant unterschieden ($p = 0,1986$). Die Mediane der Gruppen zeigten nach 72 Stunden die größte Differenz, glichen sich aber im Verlauf wieder an (s. Abbildung 18).

Im mNSS war der größte Unterschied nach 48 Stunden festzustellen. Allerdings unterschieden sich die Mediane der beiden Gruppen nicht signifikant ($p = 0,2807$). Die Mediane der verschiedenen Zeitpunkten und Gruppen sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Ergebnisse der Neuroscores im Langzeitversuch

Bederson-Score										
Zeit	24h		48h		72h		7d		14d	
	PBS	TLR4-Ak	PBS	TLR4-Ak	PBS	TLR4-Ak	PBS	TLR4-Ak	PBS	TLR4-Ak
Median	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00
1. Quartil	1,00	1,00	1,00	0,75	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3. Quartil	1,00	2,00	1,00	2,25	4,00	3,25	4,00	4,00	4,00	4,00
n-Wert	17	18	17	18	17	18	17	18	17	18
Mann-Whitney-U - Test	p = 0,1986		p = 0,6387		p = 0,9862		p = 0,6346		p = 0,8215	
mNSS										
Zeit	24h		48h		72h		7d		14d	
	PBS	TLR4-Ak	PBS	TLR4-Ak	PBS	TLR4-Ak	PBS	TLR4-Ak	PBS	TLR4-Ak
Median	14,00	14,50	15,00	13,50	10,00	8,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1. Quartil	11,00	8,50	12,00	7,25	0,00	3,75	0,00	0,00	0,00	0,00
3. Quartil	15,00	15,00	15,00	15,00	13,50	13,25	14,00	15,00	14,50	15,00
n-Wert	17	18	17	18	17	18	17	18	17	18
Mann-Whitney-U - Test	p = 0,8331		p = 0,2807		p = 0,8669		p = 0,4108		p = 0,8076	

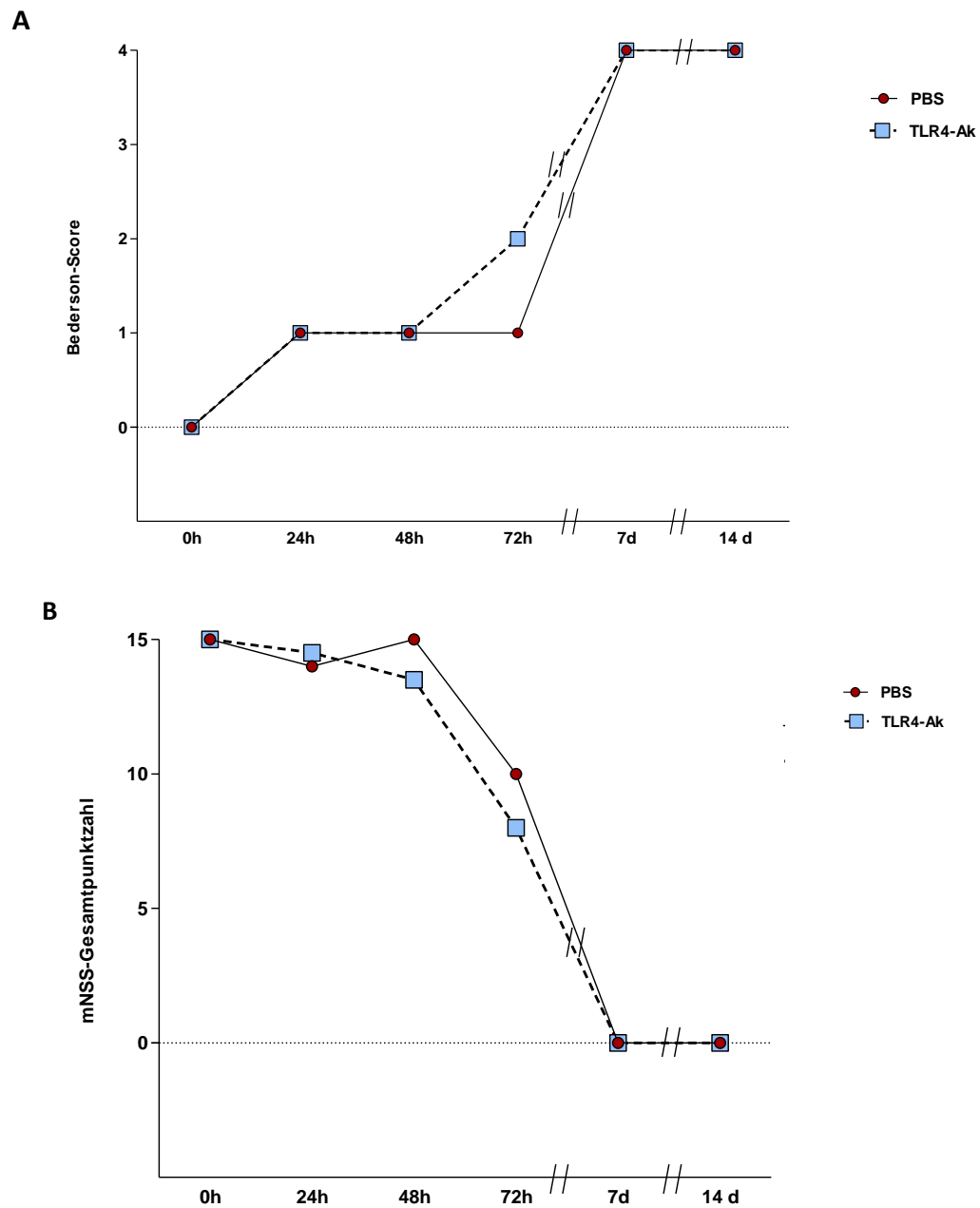


Abbildung 18: Neuroscores im Langzeitversuch

Nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation konnten über einen Reperfusionzeitraum von 14 Tagen keine signifikanten Unterschiede im neurologischen Defizit zwischen den Antikörper-behandelten Tieren (**TLR4-Ak**) und den Tieren der Kontrollgruppe (**PBS**) festgestellt werden. Dies trifft sowohl auf den Bederson-Score (**A**) als auch auf die mNSS (**B**) zu.

Da in den Scores auch verstorbene Tiere abgebildet werden, belaufen sich die Gruppengrößen zu jedem Messzeitpunkt in der Kontrollgruppe auf $n = 17$ Tiere und in der Antikörper-behandelten Gruppe auf $n = 18$ Tiere. Angesichts der Mortalitätsrate von 68,6 % (s. Kapitel 4.3.3) zeigen die bei beiden Tests die Mediane am 7. und 14. Reperfusionstag den schlechtesten Score bzw. die schlechteste Punktzahl an.

4.3.3 Mortalität

Wie bereits zuvor erläutert wurde der Versuchsaufbau für das eigentliche Langzeitexperiment so geändert, dass er in einigen Punkten von dem des Kurzzeitversuchs abwich (s. Kapitel 4.2). Ausschlaggebend für diese Änderungen war die hohe Mortalität ab dem 3. Tag nach MCAO-Induktion. Im endgültigen Versuch, dessen Aufbau zu Beginn von Kapitel 4.3 beschrieben ist, starben 68,6 % der Tiere im Verlauf (s. Abbildung 19). Diese Mortalitätsrate entspricht somit der des Pilotversuchs, der dem eigentlichen Experiment zugrunde liegt (s. Kapitel 4.2.2).

In der behandelten Gruppe erreichten sechs Tiere (33,3 %) den 14. Reperfusionstag, in der unbehandelten Gruppe waren es fünf Tiere (29,4 %). Diese Gruppengrößen liegen im Bereich der zu Beginn über die Power-Analyse berechneten Gruppengrößen (s. Kapitel 4.1.5).

In der Gruppe der behandelten Tiere betrug die mediane Überlebenszeit 121 Stunden und lag somit etwas über der medianen Überlebenszeit der Kontrollgruppe, die bei 96 Stunden lag.

Wie in vorigen Experimenten wurden die Sterbekurven der Tiere aus dem eigentlichen Experiment mit dem Log-rank-Test verglichen und ergaben einen p-Wert von $p = 0,6767$. Es ließen sich somit keine signifikanten Unterschiede im Überleben zwischen den beiden Gruppen feststellen (Abbildung 19).

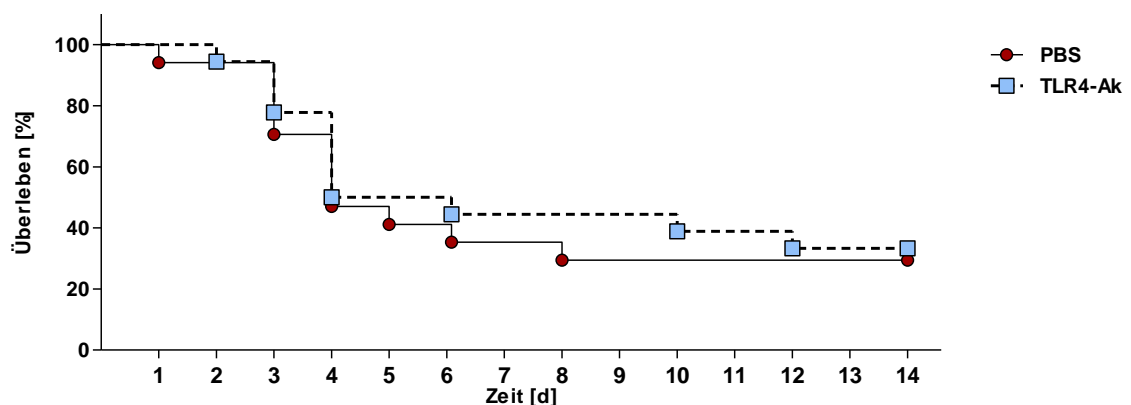


Abbildung 19: Überleben im Langzeitversuch

14 Tage nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation konnten keine signifikanten Unterschiede im Überleben zwischen den beiden Behandlungsgruppen festgestellt werden. Von der Kontrollgruppe (**PBS**) (ursprünglich $n = 17$) erreichten fünf Tiere den 14. Reperfusionstag, von der Gruppe der behandelten Tiere (**TLR4-Ak**) (ursprünglich $n = 18$) erreichten ihn sechs Tiere.

Die Abbildung entspricht einer Kaplan-Meier-Kurve. Die Kurven wurden mit dem Log-rank-Test verglichen.

4.3.4 Infarktgrößen

Nach 15-minütiger MCAO und 14-tägiger Reperfusion wurden die Gehirne entnommen und das direkte Infarktvolumen bestimmt. In den Fluoro-Jade-C-gefärbten Gehirnschnitten konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden ($p_{\text{absolut}} = 0,7922$; $p_{\text{relativ}} = 0,9307$) (s. Abbildung 21).

In der Kontrollgruppe ($n = 5$) betrug das mittlere Infarktvolumen $5,74 \text{ mm}^3$ mit einer Standardabweichung von $\pm 3,83 \text{ mm}^3$. In der TLR4-Antikörper-behandelten Gruppe ($n = 6$) war das Schlaganfallvolumen mit $5,11 \text{ mm}^3 \pm 4,21 \text{ mm}^3$ geringfügig kleiner.

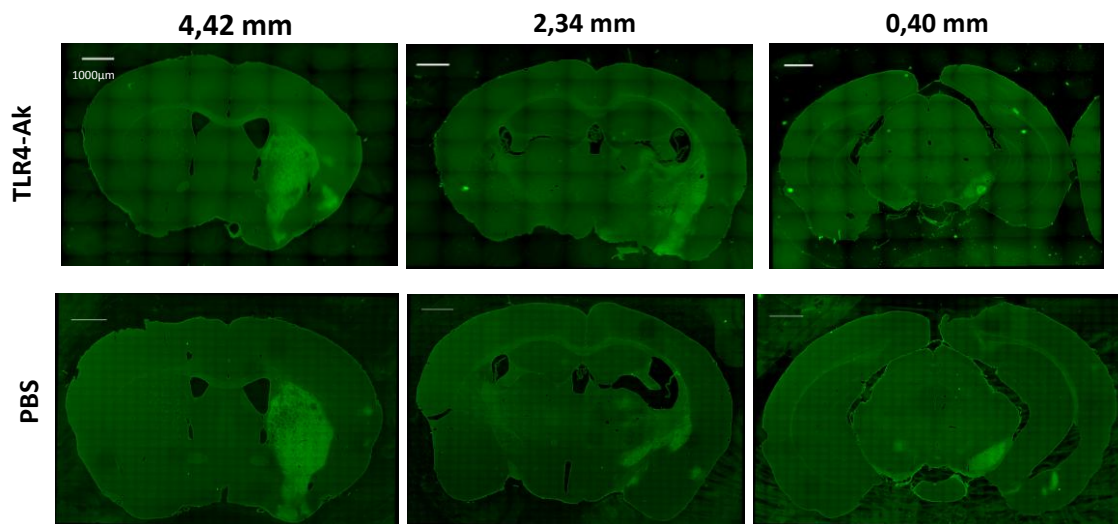


Abbildung 20: Infarktvolumetrie in Fluoro-Jade-C-gefärbten Gehirnschnitten

Nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation und 14-tägiger Reperfusion wurden die Gehirne entnommen, in $12 \mu\text{m}$ dünne Scheiben geschnitten und zur Bestimmung des Infarktvolumens mit Fluoro-Jade C gefärbt.

Beispielhaft dargestellt werden für je ein Tier der behandelten Gruppe (**TLR4-Ak**) und ein Tier der Kontrollgruppe (**PBS**) die drei für die Infarktvolumetrie verwendeten Gehirnschnitte auf Höhe der interauralen Ebenen von 4,42 mm, 2,34 mm sowie 0,40 mm. Die infarzierten Areale heben sich durch ihre hellgrün-floureszierende Färbung deutlich vom umliegenden intakten Gehirngewebe ab.

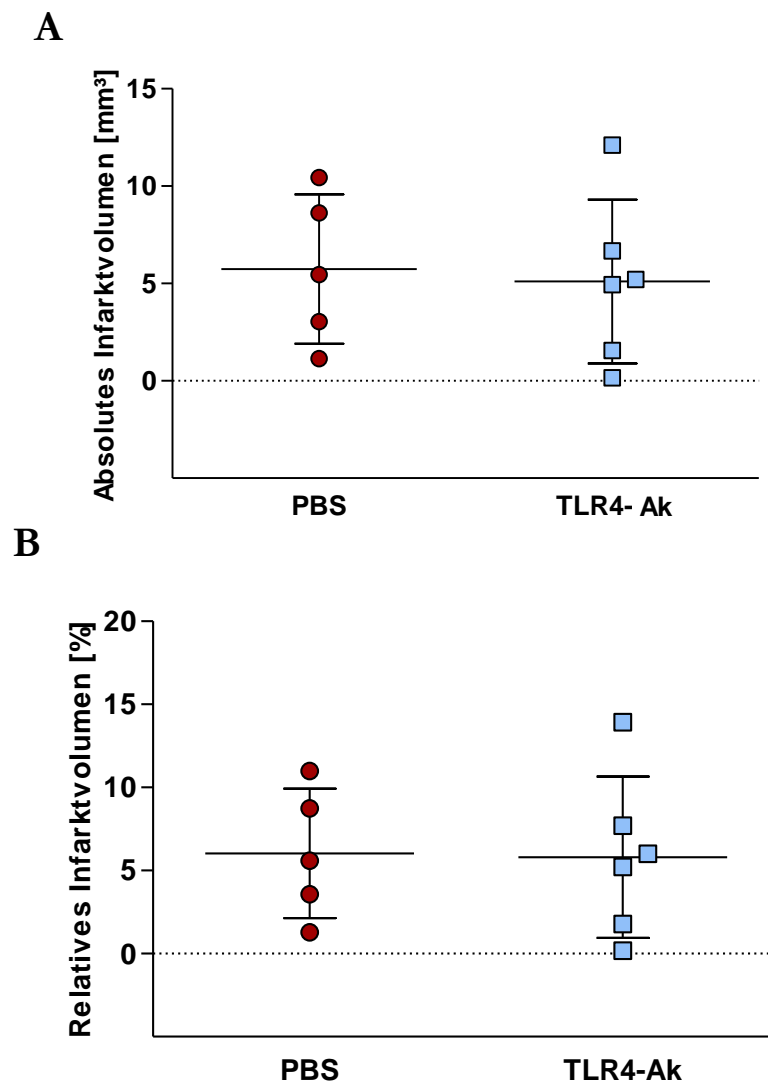


Abbildung 21: Direktes Infarktvolume im Langzeitversuch

Im Vergleich der absoluten direkten Infarktvolume (A) lassen sich 14 Tagen nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation keine signifikanten Unterschiede zwischen der behandelten Gruppe (TLR4-Ak) und der Kontrollgruppe (PBS) feststellen. Im relativen Vergleich von ipsilateralen infarzierten Gewebe zum gesunden kontralateralen Gewebe ergab sich ebenfalls kein Unterschied (B).

Die Werte werden als Scatter dot plots mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

4.3.5 Immunhistochemie

Für eine sensitivere Beurteilung möglicher TLR4-spezifischen Veränderungen nach einem ischämischen Insult wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt, um Einflüsse auf zellulärer Ebene untersuchen zu können.

4.3.5.1 TLR4-positive Zellen

Bevor Färbungen zur eigentlichen Zellquantifizierung durchgeführt wurden, wurden Gehirnschnitte von behandelten und unbehandelten Tieren sieben Tage nach MCAO mit einer TLR4-Doppel- bzw. Dreifachfärbung gefärbt, um die zelluläre Expression des TLR4-Rezeptors im postischämischen Gehirn zu charakterisieren. Demnach wurden Neurone, Astrozyten, Mikroglia und Makrophagen angefärbt (Larsen et al. 2007; Hanisch et al. 2008).

Wie erwartet, waren in allen drei Zelltypen TLR4-Signale zu erkennen, am stärksten jedoch in den Iba1- und GFAP-positiven Zellen (s. Abbildung 22 und Abbildung 23). Da eine Woche nach Reperfusionbeginn eingewanderte Makrophagen und ortsständige, aktivierte Mikroglia bereits in das ischämische Areal migriert sind (Morrison und Filosa 2013), waren Kolokalisationen von TLR4- und Iba1-positiven Zellen vorwiegend im Infarktkern, Kolokalisationen von TLR4- und GFAP-positiven Zellen noch vorwiegend an der Grenze zwischen Infarktzone und gesundem Gewebe zu sehen (s. Abbildung 22).

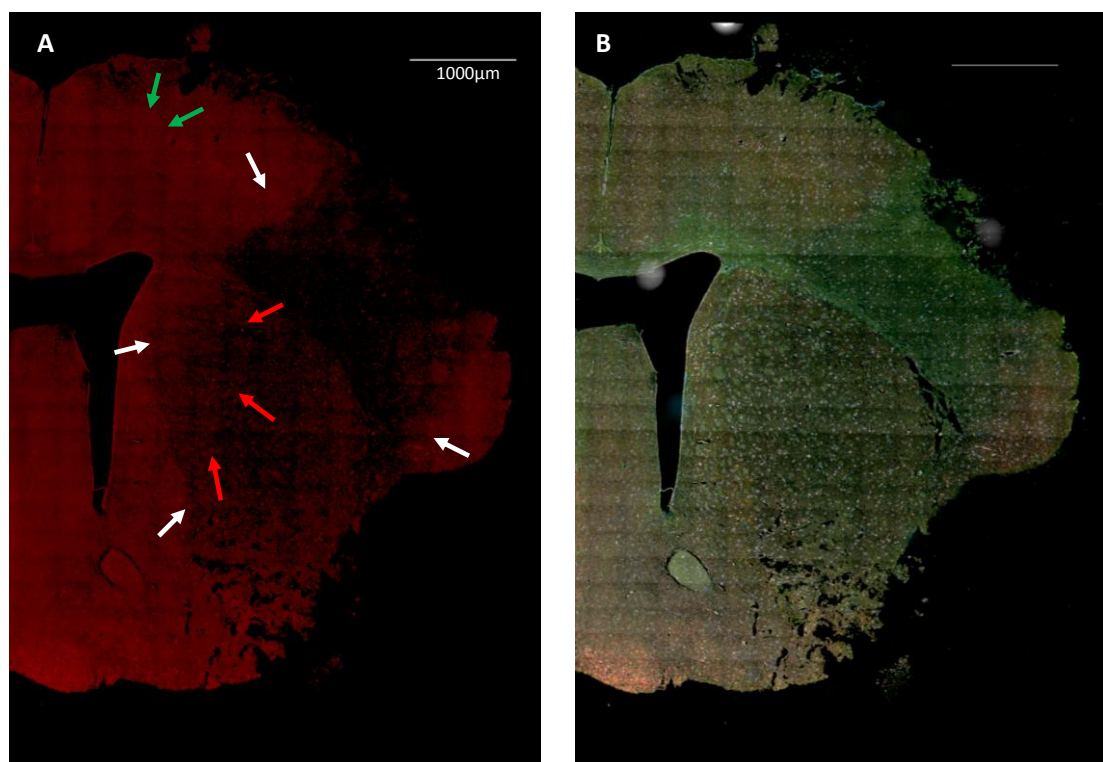


Abbildung 22: TLR4-Expression

Nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation und 7-tägiger Reperfusion wurden Iba1- und GFAP-positive Zellen mit TLR4-Antikörpern doppelgefärbt. Für diese Darstellung TLR4-exprimierender Zellen wurden Gehirne aus der Kontrollgruppe verwendet.

(A) TLR4-Färbung

(B) TLR4-Färbung in Kombination mit Iba1- und GFAP-Färbung

weiße Pfeile: TLR4-positive Astrozyten an der Grenze zwischen Infarktzone und gesundem Gewebe, rote Pfeile: TLR4-positive Mikroglia und Makrophagen im Infarktkern, rüne Pfeile: TLR4-positive Neurone vor allem im Kortex

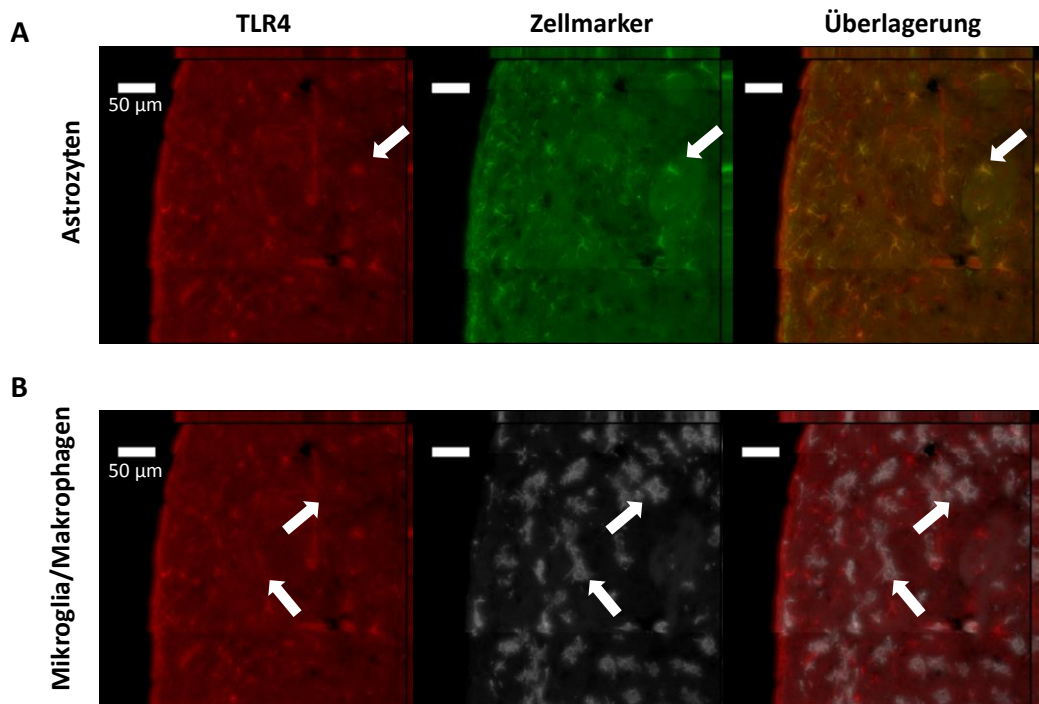


Abbildung 23: TLR4-Kolokalisation

Nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation und siebentägiger Reperfusion wurden Iba1- und GFAP-positive Zellen mit TLR4-Antikörpern doppelgefärbt. Für diesen Versuch wurden Gehirne aus der Kontrollgruppe verwendet. Abbildung **A** zeigt Kolokalisationen von TLR4-positiven Zellen und Astrozyten, Abbildung **B** Selbiges mit TLR4-positiven Zellen und Mikroglia bzw. Makrophagen.

Exemplarisch weisen Pfeile auf Kolokalisationen hin.

4.3.5.2 Zellquantifizierung

Für die Quantifizierung von Neuronen, Mikroglia und Makrophagen und Astrozyten wurden immunhistochemisch gefärbte Cryoschnitte verwendet.

4.3.5.2.1 Methodvalidierung

Für die eigentliche Zellzählung wurden nur die Gehirnschnitte der Tiere verwendet, deren Gehirne erst am 14. Tag der Reperfusion entnommen wurden.

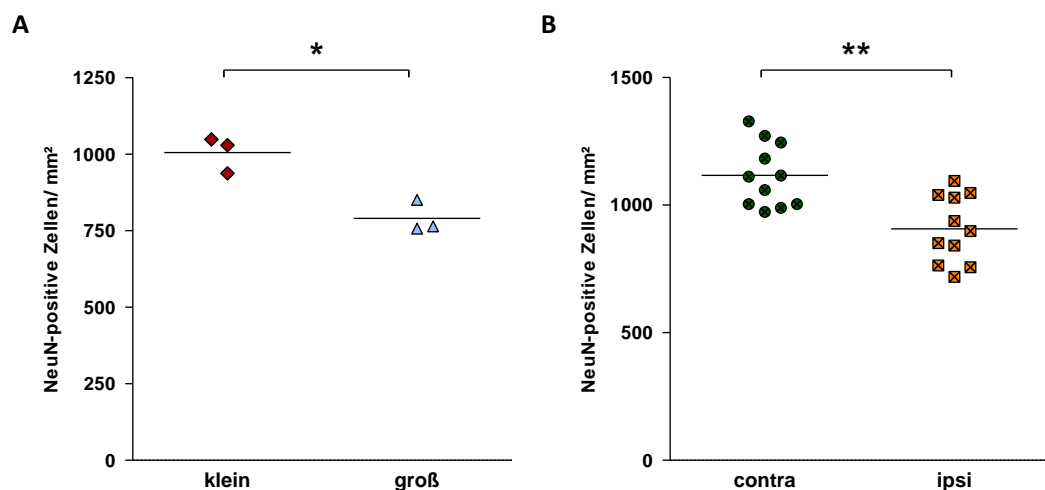
Anhand der Fluoro-Jade-C-gefärbten Schnitte ließ sich gut erkennen, wo die Infarkte sowohl innerhalb der Schnitte eines einzelnen Tieres als auch im Vergleich der Tiere untereinander am größten waren (s. Abbildung 20). Deshalb wurden zum Zellenzählen koronare Schnitte auf der Höhe von 4,42 mm in Bezug auf die interaurale Linie ausgewählt.

Wie bereits in Abschnitt 3.2.12 beschrieben, wurden GFAP- und NeuN-positive Zellen ausschnittartig in je drei Kästen pro Hemisphäre gezählt. Dass durch dieses ausschnittartige Zellenzählen Unterschiede zwischen großen und kleinen Infarkten detektiert werden konnten, zeigt folgende Untersuchung, die an Mäusegehirnen nach 15-minütiger MCAO und 14-tägiger Reperfusion durchgeführt wurde, ohne zwischen behandelten und unbehandelten Tieren zu unterscheiden:

Auf Grundlage der Fluoro-Jade-C-Färbung wurden die Neuronen- und Astrozytenzahlen der drei Gehirne mit den größten den drei Gehirnen mit den kleinsten Infarktflächen gegenübergestellt. Bei beiden Zelltypen ergaben sich signifikante Unterschiede ($p_{\text{NeuN}} = 0,05$; $p_{\text{GFAP}} = 0,05$) zwischen den Zellzahlen der beiden Gruppen (s. Abbildung 24A, C).

Auch ergaben sich zwischen den Neuronenzahlen sehr signifikante ($p_{\text{NeuN}} = 0,0024$) und zwischen den Astrozytenzahlen hoch signifikante Unterschiede ($p_{\text{GFAP}} = 0,0006$) zwischen der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre (s. Abbildung 24B, D). Hier belief sich die Gruppengröße auf $n = 11$.

In den Iba1-gefärbten Schnitten wurden alle aktivierten Makrophagen bzw. Mikroglia einer Hemisphäre gezählt. Auch hier ergab die statistische Auswertung signifikante Unterschiede zwischen den Zellzahlen bei großen bzw. kleinen Infarkten ($n = 3$, $p_{\text{Iba1}} = 0,05$) sowie hoch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Hemisphären ($n = 11$, $p_{\text{Iba1}} < 0,001$) (s. Abbildung 24E, F).



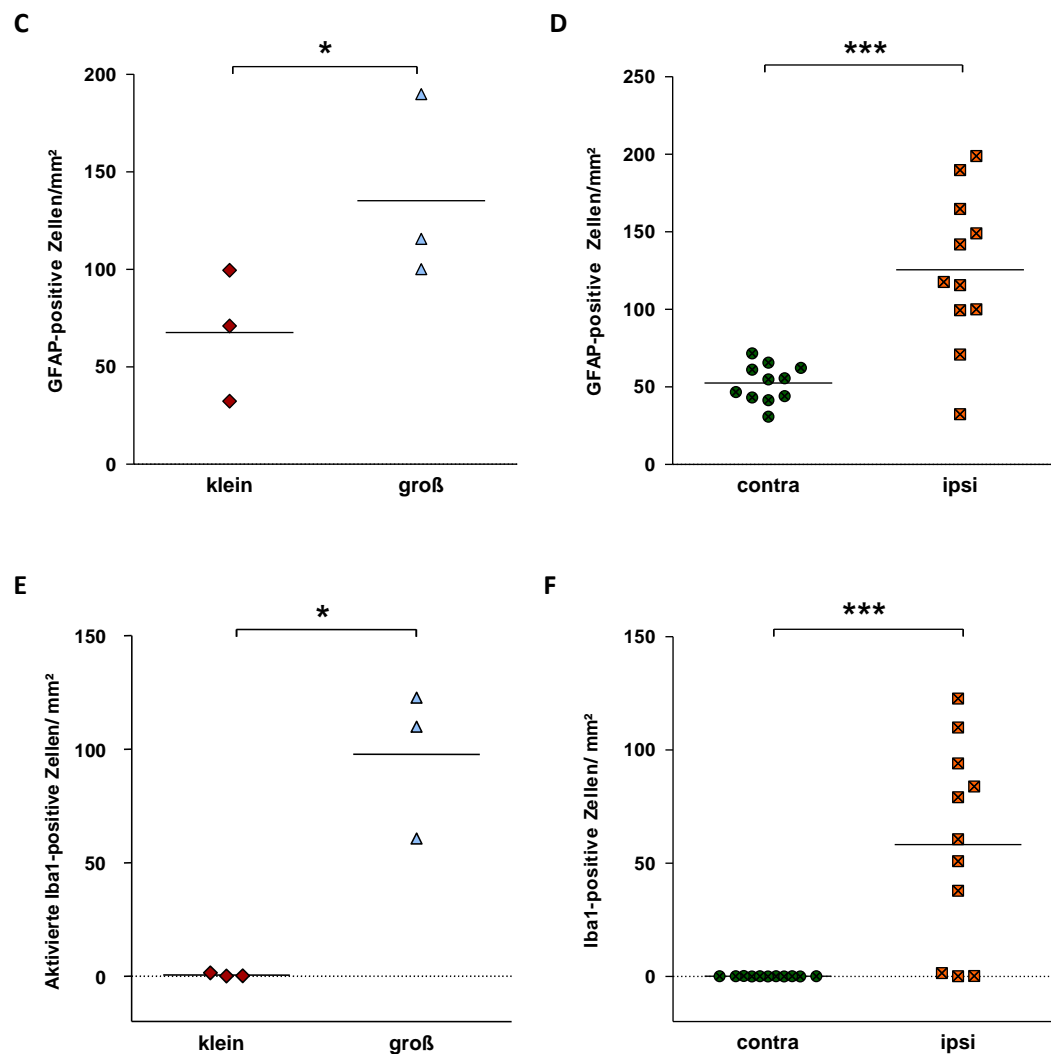


Abbildung 24: Zellquantifizierung

14 Tage nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation wurden die Gehirne TLR4-Antikörper-behandelter und unbehandelter Tiere entnommen, in 12 μ m dünne Scheiben geschnitten und für die Zellquantifizierung mit NeuN- (Neurone), Iba1- (Makrophagen/Mikroglia) und GFAP-Antikörpern (Astrozyten) immunhistochemisch gefärbt.

(A, C, E) Zur Validierung der Zählmethode wurden für jedem Zelltyp jeweils drei Gehirnschnitte mit großen Infarkten mit drei Gehirnschnitten mit kleinen Infarkten (unabhängig von der Behandlungsgruppe) auf Höhe der interauralen Ebene von 4,42 mm verglichen.

(B, D, F) Unterschiede zwischen ipsi- und kontralateraler Hemisphäre wurden anhand der Zellzahlen aller ausgezählten Gehirnschnitte detektiert (n = 11).

Statistische Signifikanzen werden mit dem einseitigen Mann-Whitney-U-Test berechnet (* $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Dargestellt werden die einzelnen Werte als Scatter dot plots mit Mittelwert.

4.3.5.2.2 Neurone

Zwei Wochen nach MCAO konnten keine Unterschiede im neuronalen Überleben zwischen den ipsilateralen Hemisphären von Tieren, die mit dem TLR4-Antikörper behandelt, und Tieren, die PBS erhielten, festgestellt werden ($p = 0,5368$) (s. Abbildung 26A). Gezählt wurden nur die Neurone, die morphologisch in der NeuN-DAPI-Überlagerung intakt erschienen (s. Abbildung 25B).

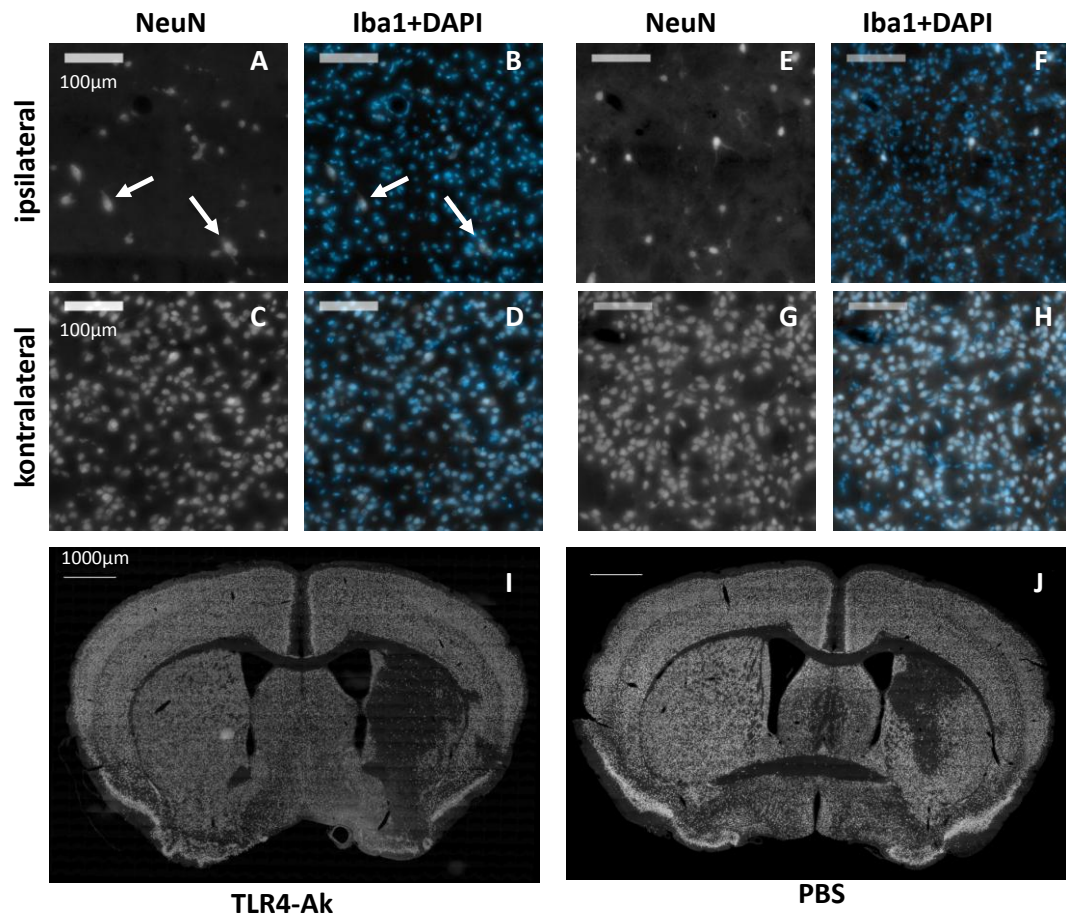


Abbildung 25: Immunhistochemische Darstellung von NeuN-positiven Zellen im Langzeitversuch

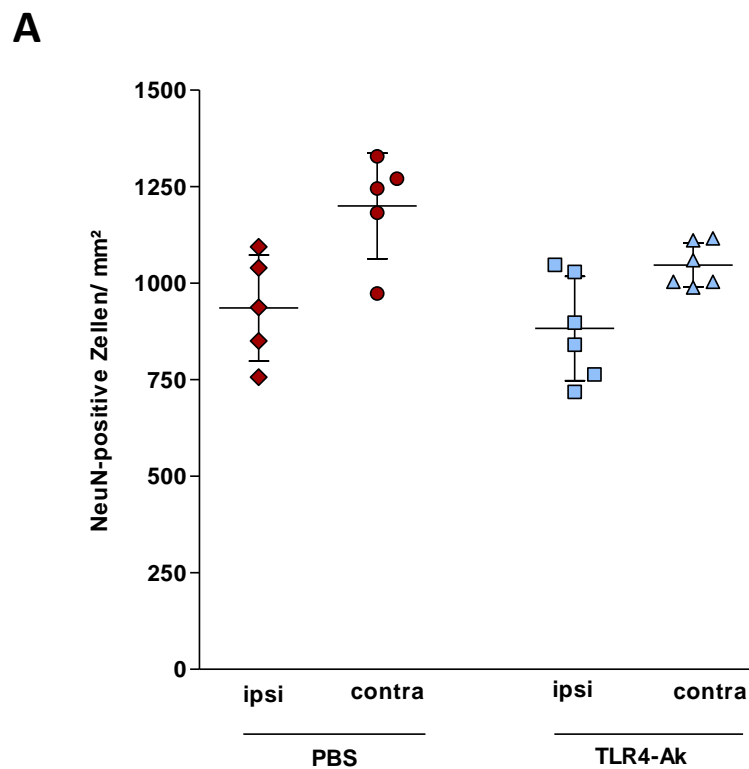
Für die Quantifizierung der intakten Neuronen 14 Tage nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation wurden Gehirnschnitte der interauralen Ebene 4,42 mm NeuN-DAPI-gefärbt (I, J).

Gezählt wurden nur morphologisch intakte Neurone, so wie sie in **A** und **B** mit Pfeilen exemplarisch an einem Gehirn eines TLR4-Antikörper-behandelten Tieres (**TLR4-Ak**) und eines Tieres aus der Kontrollgruppe (**PBS**) hervorgehoben werden.

Die durchschnittliche Anzahl an Neuronen lag in der Kontrollgruppe in der ipsilateralen Hemisphäre bei 935,8 Neuronen/ mm² mit einer Standardabweichung von $\pm 137,4$ Neuronen/ mm² (n = 5). In Gehirnschnitten der behandelten Gruppe ließen sich im Durchschnitt 883 Neurone/ mm² $\pm 135,3$ Neurone/ mm² zählen (n = 6).

Auch im Vergleich der Quotienten der beiden Gruppen ergaben sich mit einem p-Wert von $p = 0,4286$ keine signifikanten Unterschiede, auch wenn der optische Eindruck eine Tendenz zu einem verbesserten neuronalen Überleben bei den behandelten Tieren vermuten lässt (s. Abbildung 26B).

In der behandelten Gruppe lag der mittlere Quotient von Neuronen der ipsilateralen zur kontralateralen Hemisphäre bei $0,84 \pm 0,12$, in der Kontrollgruppe bei $0,79 \pm 0,12$.



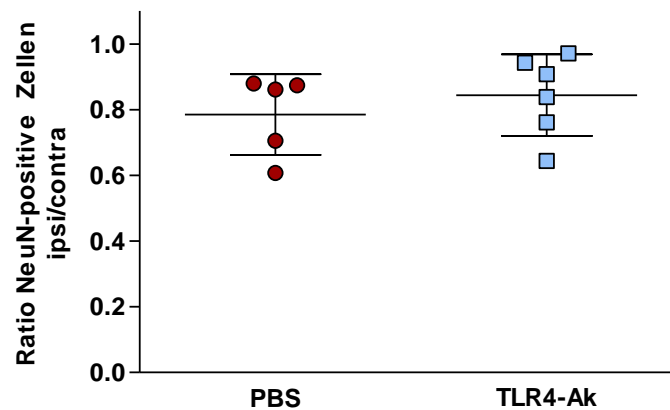
B

Abbildung 26: Neuronales Überleben im Langzeitversuch

14 Tage nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation wurden Gehirnschnitte auf Höhe der interauralen Ebene von 4,42 mm zur Quantifizierung von Neuronen mit NeuN-Antikörpern immunhistochemisch gefärbt. Es konnten weder im Vergleich der absoluten Zellzahlen (**A**) noch der relativen Zellzahlen (**B**) signifikante Unterschiede zwischen den Neuronenzahlen von TLR4-Antikörper-behandelten Tiere (**TLR4-Ak**) und der Kontrollgruppe (**PBS**) festgestellt werden.

Verglichen wurden die Ergebnisse der Neuronenzählung im beidseitigem Mann-Whitney-U-Test und werden dargestellt als Scatter dot plots mit Mittelwert und Standardabweichung.

4.3.5.2.3 Mikroglia/ Makrophagen

Während Mikroglia und Makrophagen in der Akutphase der postschämischen Entzündungsreaktion vor allen in der *Penumbra* anzutreffen sind (Gelderblom et al. 2009), sind Iba1-positive Zellen zwei Wochen nach MCAO vor allem im Infarktareal selbst zu detektieren (s. Abbildung 27I, J). Gezählt und verglichen wurden nur solche Iba1-positive Zellen, die morphologisch als aktiviert zu erkennen waren (s. Abbildung 27A, B bzw. E, F) (Morrison und Filosa 2013).

Nach zwei Wochen ließ sich kein Unterschied mehr in der Anzahl der aktivierten Mikroglia bzw. eingewanderten Makrophagen feststellen ($p = 0,7922$) (s. Abbildung 28). Die durchschnittliche Anzahl an aktivierten Iba1-positiven Zellen der infarzierten Hemisphäre lag in der Kontrollgruppe bei $54,44/ \text{mm}^2 \pm 44,55/ \text{mm}^2$ ($n = 5$). In der TLR4-Antikörper-behandelten Gruppe war die durchschnittliche Zellzahl mit $61,41/ \text{mm}^2 \pm 48,16$ geringfügig höher ($n = 6$).

In den kontralateralen Hemisphären ließen sich so gut wie keine aktivierten Mikroglia bzw. eingewanderte Makrophagen detektieren.

Diese Resultate liefern somit keinen Anhalt für einen signifikanten Einfluss der TLR4-Blockade auf die neuroinflammatorische Antwort auf einen ischämischen Insult.

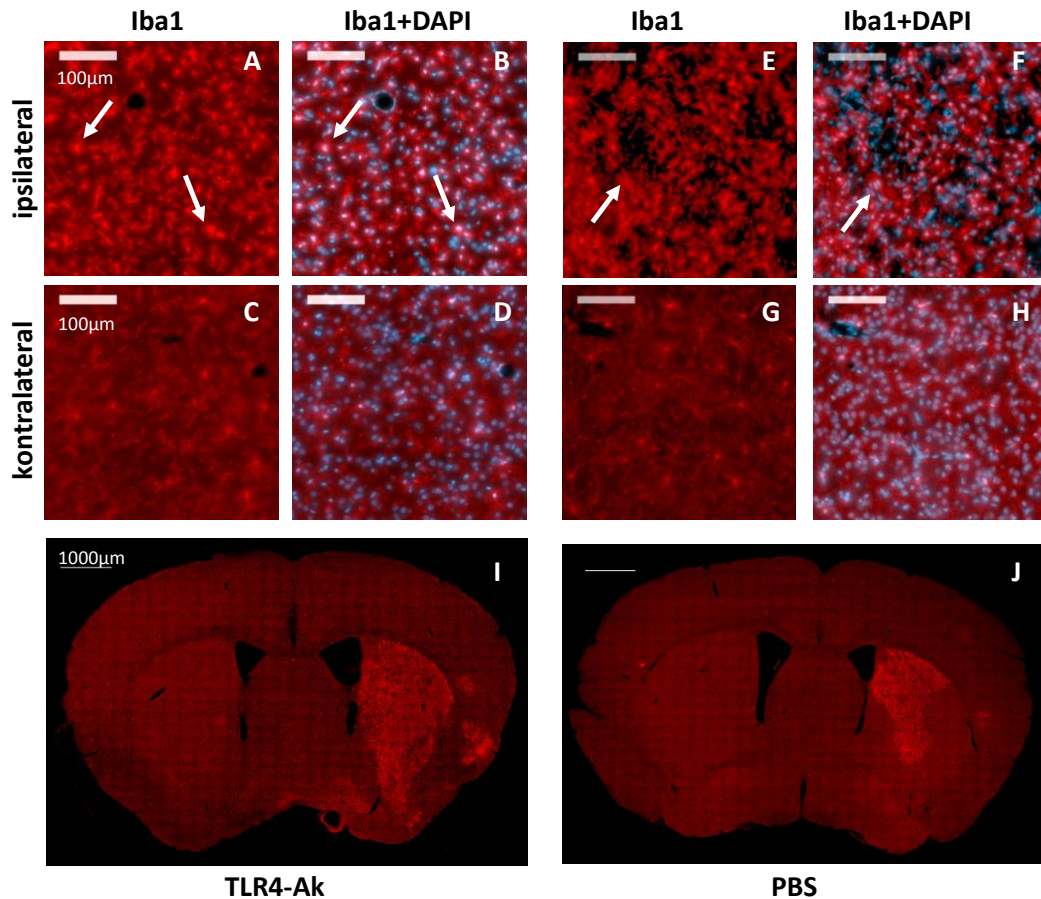


Abbildung 27: Immunhistochemische Darstellung von Iba1-positiven Zellen im Langzeitversuch

Für die Quantifizierung von aktivierter Mikroglia und eingewanderten Makrophagen 14 Tage nach 15-minütiger MCAO wurden Gehirnschnitte der interauralen Ebene 4,42 mm Iba1-DAPI-gefärbt.

Im Vergleich der kontralateralen (**C**, **G**) und ipsilateralen (**A**, **E**) Hemisphären im Bereich des Infarktes zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Morphologie der Iba1-positiven Zellen. Gezählt wurden nur die Zellen, die morphologisch als aktiviert erschienen. In den Abbildungen **A** und **B** bzw. **E** und **F** wurden solche Zellen exemplarisch an einem Gehirn eines TLR4-Antikörper-behandelten Tieres (**TLR4-Ak**) und eines Tieres aus der Kontrollgruppe (**PBS**) mit Pfeilen markiert.

Grundsätzlich befanden sich aktivierte Zellen zum untersuchten Zeitpunkt vor allem im Infarktareal (**I**, **J**).

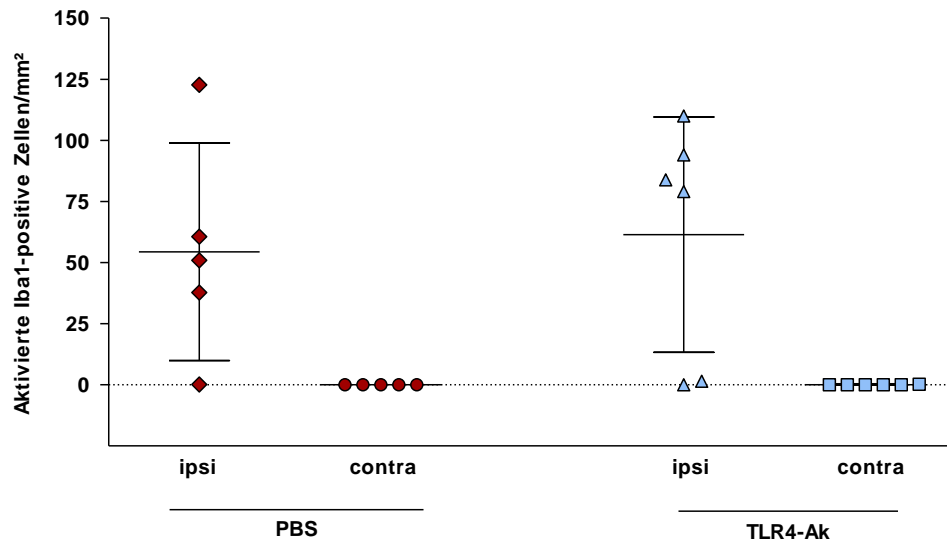


Abbildung 28: Makrophagen und Mikroglia im Langzeitversuch

14 Tage nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation wurden Gehirnschnitte auf Höhe der interauralen Ebene von 4,42 mm zur Quantifizierung von aktivierten Makrophagen und Mikroglia-Zellen mit Iba1-Antikörpern immunhistochemisch gefärbt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an aktivierten Mikroglia-Zellen und Makrophagen zwischen den TLR4-Antikörper-behandelten Tieren

4.3.5.2.4 Astrozyten

14 Tage nach 15-minütiger MCAO waren im Infarktareal selbst große Ansammlungen an GFAP-positiven Zellen zu detektieren (s. Abbildung 29I, J).

Die durchschnittliche Astrozytenzahl der ipsilateralen Hemisphäre der behandelten Tiere lag bei $130,0/ \text{mm}^2 \pm 61,73/ \text{mm}^2$ ($n = 6$), die der Kontrollgruppe bei $120,0/ \text{mm}^2 \pm 37,63/ \text{mm}^2$ ($n = 5$).

Diese geringfügig höhere Anzahl an GFAP-positiven Zellen bei den TLR4-Antikörper-behandelten Tieren erwies sich mit einem p-Wert von $p = 0,7922$ als nicht signifikant (s. Abbildung 30).

Ein signifikanter Einfluss der TLR4-Blockade auf Astroglie im postischämischen Geschehen ist durch diese Ergebnisse nicht gezeigt worden.

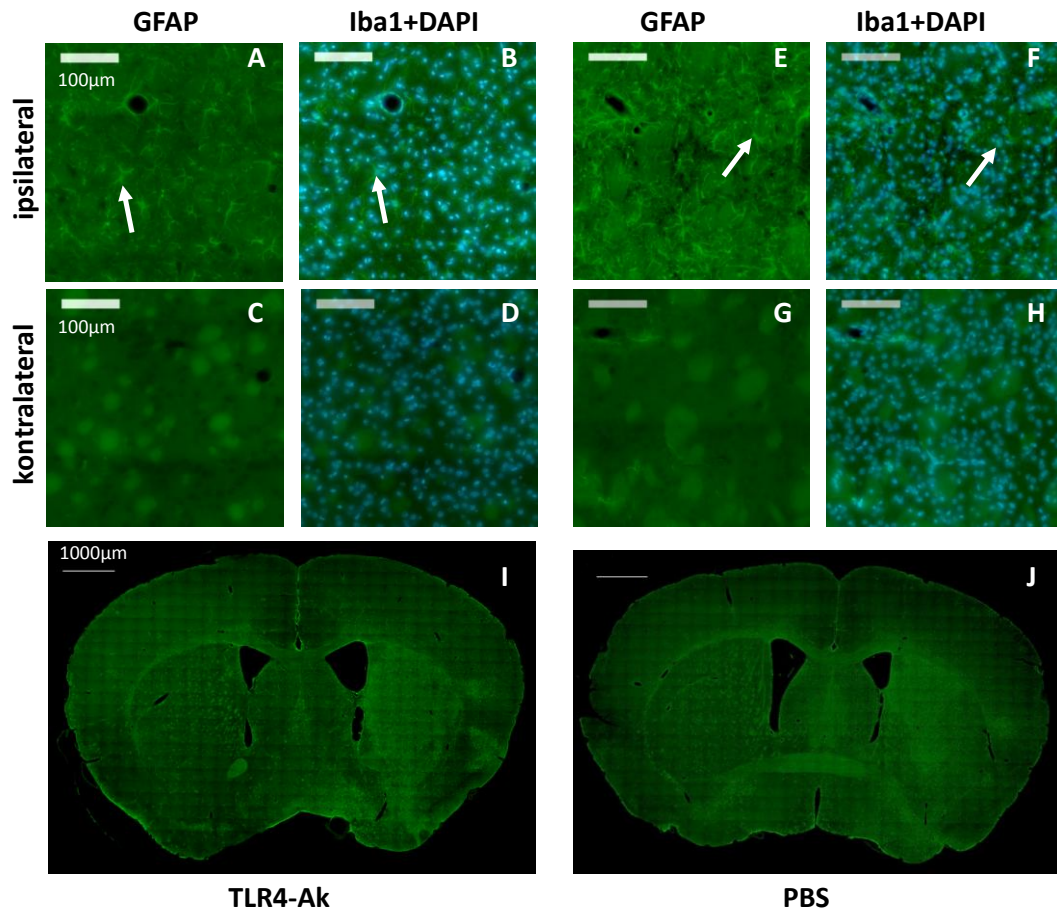


Abbildung 29: Immunhistochemische Darstellung von GFAP-positiven Zellen im Langzeitversuch

Für die Quantifizierung von Astrozyten 14 Tage nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation wurden Gehirnschnitte der interauralen Ebene 4,42 mm GFAP-DAPI-gefärbt. In den Abbildungen **A** und **B** bzw. **E** und **F** sind GFAP-positive Zellen an je einem Gehirn eines TLR4-Antikörper-behandelten Tieres (**TLR4-Ak**) und eines Tieres aus der Kontrollgruppe (**PBS**) beispielhaft durch Pfeile hervorgehoben.

Die größte Dichte an GFAP-positiven Zellen befand sich im Infarktareal (**I, J**).

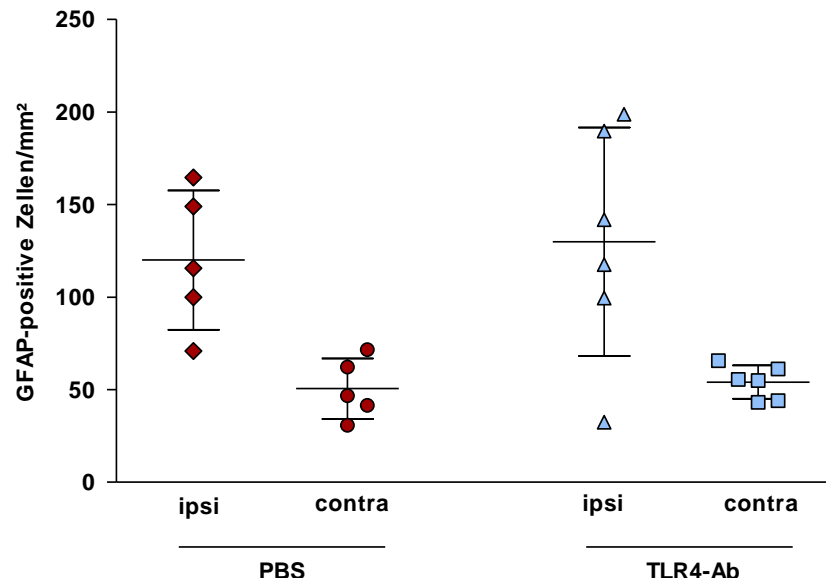


Abbildung 30: Astrozyten im Langzeitversuch

14 Tage nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation wurden Gehirnschnitte auf Höhe der interauralen Ebene von 4,42 mm zur Quantifizierung von Astrozyten immunhistochemisch mit GFAP-Antikörpern gefärbt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Astrozytenzahl zwischen den TLR4-Antikörper-behandelten Tieren (**TLR4-Ak**) und den Tieren der Kontrollgruppe (**PBS**) festgestellt werden.

Verglichen wurden die Ergebnisse der Zellquantifizierung im beidseitigem Mann-Whitney-U-Test und werden dargestellt als Scatter dot plots mit Mittelwert und Standardabweichung.

5 Diskussion

Trotz der hohen Schlaganfallinzidenz sind die verfügbaren therapeutischen Möglichkeiten, die über eine Akuttherapie mit Thrombektomie oder systemischer Lyse hinausgehen, bislang nur sehr eingeschränkt. Verschiedene Arbeitsgruppen arbeiten an neuroprotektiven Therapieansätzen, um den postischämischen Schaden zu reduzieren. Einer der möglichen Ansätze ist die Modulation der postischämischen Inflammation.

Der Toll-ähnliche Rezeptor 4 mit seiner Expression auf neuronalen, glialen und astroglialen Zellen bietet in diesem Zusammenhang einen vielversprechenden Ansatz.

Bislang wurden die Effekte einer TLR-Inhibition nach ischämischem Insult meist in einem Zeitfenster von 24 bis 72 Stunden nach Ischämie, also während der Akutphase der postischämischen Entzündungsreaktion (Bohacek et al. 2012) untersucht. In diesem Zeitraum ist eine TLR4-Aktivierung mit einer Verstärkung der inflammatorischen Signalkaskaden sowie der Ausweitung des Gewebeschadens assoziiert. Verschiedene Studien, darunter auch arbeitsgruppeninterne Experimente sowie das Kurzzeitexperiment meiner Doktorarbeit, konnten durch eine TLR4-Inhibition bzw. -Defizienz eine Verbesserung des neurologischen Outcomes sowie eine Reduktion des Gewebeschadens zeigen (Cao et al. 2007; Caso et al. 2007; Suzuki et al. 2012; Hua et al. 2015).

Allerdings werden der TLR4-Aktivierung auch neuroprotektive Eigenschaften zugesprochen, sodass eine Inhibition womöglich die postischämische Regeneration erschweren könnte (Hanisch et al. 2008; Pradillo et al. 2009; Wang et al. 2011; Moraga et al. 2014). Aus diesem Grund habe ich in meiner Doktorarbeit die Effekte der TLR4-Inhibition in einem Langzeitmodell des experimentellen Schlaganfalls untersucht.

5.1 Neuroprotektive Wirkung der TLR4-Inhibition

Zur Beurteilung der langfristigen Neuroprotektion nach zerebraler Ischämie durch TLR4-Inhibition wurden 14 Tage nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller PBS- bzw. TLR4-Antikörper-Applikation die Gehirne der operierten Tiere entnommen und Infarkt volumina bestimmt. Außerdem wurden am Schlaganfall-induzierten Gewebeschaden beteiligte TLR4-exprimierende Zellen wie Neurone, aktivierte Mikroglia und Makrophagen sowie Astrozyten quantifiziert. Nach zweiwöchiger Reperfusion konnte weder in Bezug auf die

makroskopischen, noch auf die mikroskopischen Infarktparameter ein Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Mäusen festgestellt werden. Auch zeigte die TLR4-Inhibition nach 15-minütiger Ischämie keinen langfristigen Effekt auf das funktionelle Outcome, das anhand von Neuroscores bestimmt wurde. Ein signifikanter Unterschied im Überleben der beiden Gruppen war ebenfalls nicht erkennbar.

Diese Ergebnisse lassen zwei Möglichkeiten der Interpretation zu:

1. Die TLR4-Inhibition ist langfristig neuroprotektiv, aber konnte durch die angewandten Methoden zur Effektgrößenbestimmung nicht nachgewiesen werden.
2. Die TLR4-Inhibition nach milder Ischämie ist langfristig nicht protektiv.

Um sich einer Antwort zu nähern, ist es sinnvoll, sich noch einmal den aktuellen Kenntnisstand zur therapeutischen TLR4-Forschung vor Augen zu führen. Bislang sind in Bezug auf Langzeiteffekte der experimentellen TLR-Defizienz nach Schlaganfall nur Studien mit genetisch veränderten Tiermodellen bekannt (Caso et al. 2007; Moraga et al. 2014). Demnach sind nur annähernde Vergleiche möglich.

Die erste Interpretationsmöglichkeit der Daten dieser Arbeit ("Die TLR4-Inhibition ist langfristig neuroprotektiv, aber konnte durch die angewandten Methoden zur Effektgrößenbestimmung nicht nachgewiesen werden.") wird durch folgende Studien gestützt:

Caso et al. (2007) konnten in TLR4-defizienten Mäusen auch am 7. Tag nach Ischämie noch signifikant kleinere Infarktvolumina gegenüber der Kontrollgruppe feststellen. Erklärt wird dieser Effekt durch eine verminderte TLR4-vermittelte Expression der NF κ B-abhängigen induzierbaren NO-Synthase und Cyclooxygenase 2, die nach Ischämie Zellschädigungen durch die Freisetzung von Stickstoff- und Sauerstoffradikalen begünstigen (Caso et al. 2007). Auch konnte eine verminderte Expression der Matrix-Metalloproteinase 9 festgestellt werden (Caso et al. 2007). Dies führt zu einer geringeren Blut-Hirn-Schranken-Durchlässigkeit, kleineren Gehirnschwellungen und weniger hämorrhagischen Transformationen (Asahi et al. 2001; Caso et al. 2007; Jin et al. 2010). Die langfristig kleineren Infarktvolumina in TLR4-defizienten Mäusen konnten durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden (Moraga et al. 2014). Allerdings

beruhen diese Versuche auf permanenten Schlaganfallmodellen und erschweren einen 1:1-Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

Langzeitstudien mit transienten MCAO-Modellen sind im Gegensatz zu den permanenten Modellen (Caso et al. 2007; Moraga et al. 2014) in der TLR4-Forschung bislang nicht bekannt, wohl aber in der Forschung am verwandten TLR2-Rezeptor: Die Arbeitsgruppe um Bohacek et al. (2012) untersuchte die Langzeitwirkung einer TLR2-Defizienz an Knockoutmäusen nach 60-minütiger MCAO. Ähnlich wie in Kurzzeitmodellen mit TLR4-defizienten Tieren wiesen TLR2-defiziente Tiere nach 72 Stunden kleinere Infarktvolumina auf als Wildtypiere der Kontrollgruppe. Allerdings ließen sich bereits sieben Tage nach MCAO diese neuroprotektiven Effekte der TLR2-Defizienz nicht mehr nachweisen: Sowohl eine als auch zwei Wochen nach MCAO waren die Infarktvolumina und die Zahl apoptotischer Neurone in den TLR2-Knockoutmäusen signifikant größer (Bohacek et al. 2012). Als Erklärung für diese Wandlung des Effekts wird eine verzögerte Immunreaktion in den TLR2-defizienten Mäusen angenommen (Bohacek et al. 2012). Die signifikant größeren Infarktvolumina der TLR2-defizienten Tiere wird durch ein Ausschalten der TLR2-bedingten neuroprotektiven Vorgänge erklärt, zu denen die Freisetzung von IGF-1 gehört (Bohacek et al. 2012). Eine TLR2-Defizienz führt zu einer verminderten Freisetzung von IGF-1 aus Mikroglia und verursacht somit langfristig einen größeren Gewebeschaden (Bohacek et al. 2012).

Anhalt für eine Aufhebung der initialen neuroprotektiven Wirkung der TLR4-Inhibition im zeitlichen Verlauf (Hypothese: "Die TLR4-Inhibition nach milder Ischämie ist langfristig nicht protektiv.") geben nicht nur die Ergebnisse von Bohacek et al. (2012), sondern auch Studien, die den *Toll-like receptor 4* selbst auf neuroprotektive Eigenschaften im Zusammenhang mit zerebraler Ischämie untersuchen (Hanisch et al. 2008; Pradillo et al. 2009; Moraga et al. 2014).

Nimmt man an, dass langfristig die neuroprotektiven Eigenschaften des TLR4 gegenüber seinen neurodestruktiven Eigenschaften überwiegen, könnte dies den fehlenden Unterschied zwischen den TLR4-defizienten und -potenten Tieren der Experimente dieser Arbeit erklären.

Wie in Kapitel 1.6.2 beschrieben, können über die TLR4-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 auch nicht-inflammatorische Signalwege in Gang gesetzt werden (Kawai et al. 2001), über die u.a. Zytokine wie Interferon β (IFN β) freigesetzt werden (Jung et al. 2005). Für IFN β ist bekannt, dass es im Zusammenhang mit LPS-

induzierter TLR4-Aktivierung Apoptose in Mikroglia induziert. Laut Hanisch et al. (2008) gibt es durch TLR-Stimulation ein frühes und ein spätes Antwortprofil in derselben Zelle, welches sich darin äußert, dass mit einer Herunterregulierung proinflammatorischer Zytokine die Hochregulierung antiinflammatorischer Zytokine einhergeht. Dieses Umprogrammieren der zellulären Signalwege hat man in der Schlaganfallforschung bei Präkonditionierungsversuchen zeigen können (Marsh et al. 2009; Pradillo et al. 2009). Hier wird durch eine kurze präischämische TLR4-Stimulation eine milde proinflammatorische Zytokinfreisetzung induziert (Pradillo et al. 2009). Folgt in einem kurzen zeitlichen Abstand ein Schlaganfall, wird die Transduktion von Genen weniger über NF κ B- sondern mehr über IRF3-abhängige Signalwege angeregt (Marsh et al. 2009). Zusätzlich wird über IFN β die Freisetzung von proinflammatorischen Enzymen sowie Zyto- und Chemokinen reduziert (Wang et al. 2011). Dieser Effekt ist abhängig vom Zeitpunkt und der Intensität der präischämischen Konditionierung (Gesuete et al. 2014).

Da weder in meinen noch in anderen Experimenten zur postischämischen TLR4-Induktion eine Präkonditionierung vorausgegangen ist, kann nicht davon ausgegangen werden, dass eine postischämische Blockade die soeben beschriebene TLR4-bedingte Neuroprotektion vermindert. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und der anderer Arbeitsgruppen lässt sich also hierdurch nicht erklären.

Bohacek et al. (2012) erklären ihre Ergebnisse durch postischämische Neuroprotektion. Seit Kurzem gibt es diesbezüglich auch neue Erkenntnisse zu einer potenziellen Beteiligung der Toll-ähnlichen Rezeptoren 4 (Moraga et al. 2014).

Die Arbeitsgruppe um Moraga et al. (2014) konnte zeigen, dass in TLR4-defizienten Mäusen Neuroblasten aus der subventrikulären Zone mit einer zeitlichen Verzögerung und in geringerer Dichte ins geschädigte Gewebsareal migrieren und schließen aus diesen Ergebnissen, dass TLR4 an der Rekrutierung von Neuroblasten und somit an postischämischen Reparaturmechanismen beteiligt ist. Diese Effekte konnten bereits sieben Tage nach Ischämie gezeigt werden (Moraga et al. 2014). Da aber im gleichen Experiment zum gleichen Zeitpunkt der Gewebeschaden in TLR4-defizienten Mäusen signifikant kleiner war als in Wildtyp-Tieren (Moraga et al. 2014), kann nach bisherigem Kenntnisstand nicht davon ausgegangen werden, dass langfristig die neuroprotektiven Eigenschaften des TLR4 überwiegen.

Um also auf die Frage nach den Langzeiteffekten der TLR4-Inhibition nach Schlaganfall zurückzukommen: Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen lassen direkt oder indirekt auf ein großes therapeutisches Potenzial einer postischämischen TLR4-Blockade

schließen. Meine Ergebnisse bestätigen diese Rückschlüsse auf den ersten Blick nicht: Nach 14 Reperfusionstagen gibt es weder Anhalt für positive noch für negative Effekte der TLR4-Inhibition: Es lassen sich grundsätzlich keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen, demnach auch kein TLR4-Antikörper-assoziiertes Schaden im Vergleich zur Kontrollgruppe, wodurch sich die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich von denen der TLR2-Langzeitstudie von Bohacek et al. (2012) unterscheiden.

Auf den zweiten Blick fällt auf, dass auch schon zu früheren Zeitpunkten, zu denen von verschiedenen Arbeitsgruppen eine neuroprotektive Wirkung der TLR4-Inhibition oder -Defizienz nachgewiesen wurde (Suzuki et al. 2012; Hua et al. 2015), in den erhobenen Parametern (Gewicht, Temperatur, Neuroscore, Überleben) keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt wurden. Eine nachlassende Antikörper-Wirkung als Erklärung für den fehlenden Unterschied zwischen den Gruppen nach zwei Wochen ist durch diese Erkenntnis sehr unwahrscheinlich, wenn auch keine Versuche zur Wirkdauer der Antikörper vermittelten TLR4-Blockade durchgeführt wurden. Hieraus schließe ich, dass mein Modell der milden und transienten fokalen Ischämie in Kombination mit der Antikörper-induzierten TLR4-Defizienz nicht ausreicht, um mit den verwendeten Methoden die Effekte voriger Arbeitsgruppen mit permanenter fokaler Ischämie und einer genetisch bedingten TLR4-Defizienz aufzuzeigen.

Methodenspezifische Aspekte werden ausführlicher in den folgenden Kapiteln diskutiert.

5.2 Mortalität als Komplikation des Schlaganfalls

Viele Arbeitsgruppen terminieren ihre Versuche zur Schlaganfallforschung nach 24-stündiger Reperfusion, vermutlich aufgrund der hohen Mortalität nach diesem Zeitpunkt (Baron et al. 2013). Für Langzeituntersuchungen mit Modellen transientser MCAO wird daher empfohlen, zunächst milde Schlaganfälle zu produzieren und so eine hohe Sterberate zu vermeiden (Katchanov et al. 2003).

Unter einem "milden" Schlaganfallmodell verstehen Katchanov et al. (2003) eine Okklusionszeit von 30 Minuten, durch die ein selektiver neuronaler Zelluntergang induziert wird. In vielen Publikationen fehlt die Angabe der Mortalitätsrate oder ist ungenau, worauf in letzter Zeit vermehrt durch Reviews und den *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* aufmerksam gemacht wird (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) 1999; Dirnagl 2006; Baron et al. 2013; Fisher et al. 2009; Braeuninger und Kleinschnitz 2009).

Dies belegt, dass auch andere Arbeitsgruppen mit einer ähnlichen hohen Mortalität konfrontiert werden.

Die Verkürzung der Okklusionszeit auf 15 min sowie die Einführung einer intensivierten postoperativen Behandlung verringerten zwar die postischämische Mortalität in meinen Experimenten, die Mortalitätsrate nach zwei Wochen beträgt trotzdem 68,6 %. Im Folgenden möchte ich Erklärungsansätze bieten.

5.2.1 Verschiedene Parameter und ihr Einfluss auf die Mortalität

Da sich das prozentuale Überleben zwischen den beiden Gruppen nur geringfügig unterscheidet, können alle Parameter, die sich nur auf eine der beiden Gruppen auswirken, als Ursache für die Mortalität ausgeschlossen werden. Demnach ist beispielsweise nicht davon auszugehen, dass der TLR4-Antikörper in der verwendeten Dosis von 1 µg langfristig toxische Nebenwirkungen aufweist.

Auch können viele potenzielle Ursachen, die beide Gruppen gleichermaßen betreffen, ausgeschlossen werden.

Dies betrifft u.a. den Einfluss der Operationserfahrung auf die postischämische Mortalität. Komplikationen durch den invasiven Eingriff selbst äußern sich durch ein Sterben innerhalb der ersten postoperativen Stunden. In meinen Versuchen verstarben die meisten Tiere im Zeitraum zwischen 72 und 96 Stunden *post reperfusionem*. Auch konnte kein Unterschied zwischen meinen operativen Fertigkeiten und denen nach 7-jähriger MCAO-Erfahrung festgestellt werden (s. Kapitel 4.2.3). Eine postischämische Mortalität als Ausdruck von Operationskomplikationen ist somit nicht anzunehmen.

Da die Tiere der einzelnen Experimente aus verschiedenen Chargen und z.T. von verschiedenen Lieferanten stammen und die Experimente erst nach der empfohlenen Eingewöhnungszeit von 14 Tagen begonnen wurden, kann Zucht-, Transport- oder Eingewöhnungsstress als erschwerender Faktor in der postoperativen Erholung ausgeschlossen werden.

Bei einer Okklusionszeit von 15 min kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Tiere an den Folgen eines erhöhten intrakraniellen Drucks verstarben, da bereits nach 30-minütiger MCAO im Vergleich zu längeren Okklusionszeiten nur ein selektiver neuronaler Zellschaden induziert wird (Katchanov et al. 2003).

Ein Einfluss der intraarteriellen Verabreichung des Antikörpers auf das postischämische Überleben durch ein erhöhtes Stresspotenzials dieses Eingriffs ist denkbar, aber dennoch

unwahrscheinlich. In den meisten MCAO-Modellen mit intravasaler Applikation werden Substanzen zwar intravenös verabreicht, doch ist davon auszugehen, dass dies auf die einfachere Handhabung und größere Nähe zur klinischen Anwendung zurückzuführen ist. Studien mit intraarterieller Applikation weisen in den ersten 96 Stunden nach Ischämie keine Auffälligkeiten im Überleben auf (Ziegler et al. 2011; Zhang et al. 2012). Die Datenlage von Langzeitstudien mit intraarterieller Applikation ist begrenzt, aber die bekannten Kurzzeitstudien (Ziegler et al. 2011; Zhang et al. 2012) geben keinen Anlass, Rückschlüsse von der Applikationsart auf das Langzeitüberleben zu ziehen.

5.2.2 Der Einfluss postischämischer Infektionen auf die Mortalitätsrate

Die wahrscheinlichste Erklärung der postischämischen Mortalität ist eine durch die Schlaganfall-induzierte Immunsuppression ausgelöste letale Infektion oder Sepsis.

Verschiedene Studien geben Anlass für diese Schlussfolgerung. Grundsätzlich zählen Infektionen zu den häufigsten Komplikationen nach einem Schlaganfall. Sie treten laut einer gepoolten Analyse verschiedener Studien bei ungefähr 30 % aller Schlaganfallpatienten auf, wobei im Einzelnen Infektionsraten von 5 - 65 % möglich sind (Westendorp et al. 2011). Am häufigsten sind die Lunge und der Urogenitaltrakt von Infektionen betroffen (Westendorp et al. 2015). Vor allem Pneumonien sind stark mit der Schwere des Infarktes sowie einem schlechten funktionellen Outcome und postischämischen Langzeitüberleben assoziiert (Saposnik et al. 2008; Finlayson et al. 2011; Westendorp et al. 2011). Ihre hohe Inzidenz ist nicht allein auf Aspirationen und mechanische Ventilation, sondern auch auf das Vorliegen des *Stroke-induced immunodepression syndrome* zurückzuführen (s. Kapitel 1.2.3) (Prass et al. 2003; Westendorp et al. 2011).

Während große Infarkte und ihre direkten Komplikationen primär die Mortalität in der Akutphase des Schlaganfalls bedingen, machen Infektionen, vor allem Pneumonien, den Großteil an Todesfällen der postakuten postischämischen Phase aus (Prass et al. 2003; Meisel et al. 2004).

5.2.3 Präventive Antibiotikagabe zur Senkung postischämischer Infektionen

Bislang werden postischämische Infektionen bei Schlaganfallpatienten nur nach ihrem Auftreten antibiotisch behandelt (Leitlinie ischämischer Schlaganfall 2012). Eine präventive postischämische Antibiotikagabe wird nicht empfohlen (Leitlinie ischämischer Schlaganfall 2012). Verschiedene Studien konnten hierdurch zwar eine signifikante Reduktion der Infektionsrate nachweisen, jedoch bisher keinen Einfluss auf ein verbessertes

neurologisches Langzeit-Outcome oder eine Senkung der Mortalität feststellen (Harms et al. 2008; Kohler et al. 2013; Westendorp et al. 2015).

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu tierexperimentellen Schlaganfallstudien. Sowohl die präventive Gabe von Ceftriaxon als auch von Moxifloxacin konnte in Tiermodellen eine Senkung der postischämischen Mortalität bezwecken (Meisel et al. 2004; Thöne-Reineke et al. 2008). Ceftriaxon weist zusätzlich über eine erhöhte Aktivität bzw. Expression des astrozytären Glutamattransporters GLT1 eine neuroprotektive Wirkung auf (Rothstein et al. 2005; Thöne-Reineke et al. 2008).

Durch die Verabreichung von 200 mg Ceftriaxon/ kg Körpergewicht nach 90-minütiger MCAO konnte die postischämische Mortalität in Ratten von 35 % auf 0 % gesenkt werden (Thöne-Reineke et al. 2008). Einen ähnlichen Effekt durch die Ceftriaxon-Behandlung erwartete ich bei meinen Experimenten. Zwar ließ sich die postischämische Mortalität auf 68,6 % senken, doch ist diese Mortalitätsrate in Anbetracht der intensivierten postoperativen Behandlung und der kurzen Okklusionszeit weiterhin sehr hoch. Thöne-Reineke et al. (2008) zufolge hätte der Effekt der Antibiotikabehandlung größer sein müssen. Ihre Versuche zeigten eine gesteigerte Aktivität von GLT1-Transportern und eine erhöhte Expression von mRNA neurotropher Substanzen in behandelten Tieren. In Bezug auf Infektparameter konnte kein Unterschied detektiert werden. Der Erfolg der Antibiotikabehandlung wird demnach auf neuroprotektive Effekte zurückgeführt und nicht auf eine Verhinderung des SIDS (Thöne-Reineke et al. 2008). Eine postischämische Mortalität als Folge von Schlaganfall-induzierter Immunsuppression ist somit trotz Ceftriaxon-Behandlung möglich.

Gestützt wird diese Erkenntnis durch die Tatsache, dass Ceftriaxon, obwohl es sowohl gegen gramnegative als auch grampositive Erreger wirksam ist (Neu et al. 1981), im humanen Schlaganfall nur Urogenitaltraktinfektionen signifikant reduziert (Westendorp et al. 2015). Das postischämische Langzeitüberleben wird aber auch von Pneumonien beeinflusst (s. Kapitel 5.2.2), die sich beim Patienten durch die Gabe von Ceftriaxon nicht signifikant reduzieren lassen (Westendorp et al. 2015). Es ist somit anzunehmen, dass auch in den murinen Experimenten dieser Arbeit die Antibiotikagabe keine Reduktion der Pneumonieinzidenz zur Folge hatte.

Dies ermöglicht Vergleiche mit Experimenten, in denen eine 57- bzw. 60-prozentige postischämische Mortalität am 6. bzw. 7. Reperfusionstag der meinen gleicht (Prass et al. 2003; Meisel et al. 2004). In Analogie zu meinen Untersuchungen kündigte sich bei diesen Tieren das Sterben ebenfalls durch einen drastischen Abfall der Körpertemperatur an, den sowohl Prass et al. (2003) als auch Meisel et al. (2004) als Anzeichen einer Sepsis deuten,

die zusammen mit Pneumonien häufig aus Schlaganfall-induzierter Immundefizienz hervorgeht.

Das Ausbleiben der Hypothermie sowie eine auf ca. 20 % reduzierte Mortalität bei Moxifloxacin-behandelten Tieren lassen sich am ehesten durch die Verhinderung von SIDS-induzierten Infekten erklären (Meisel et al. 2004). Die Korrelation von Mortalität, Temperatur- und Gewichtsverlauf zwischen meinen und den Moxifloxacin-unbehandelten Mäusen von Meisel et al. (2004) stärkt die oben genannte These einer Infekt-induzierten Mortalität.

Es ist folglich möglich, dass bei sonst unverändertem Versuchsaufbau eine antibiotische Behandlung der Tiere mit Moxifloxacin das postischämische Überleben verbessern und eine Interpretation der Effekte der TLR4-Inhibition erleichtern könnte.

Die von Meisel et al. (2004) verwendete Dosis von 100 mg/ kg Körpergewicht war allerdings mit den pharmakologisch verfügbaren gering konzentrierten Infusionslösungen nicht ohne die Applikation von letalen Flüssigkeitsmengen zu erreichen (Details im Anhang). Da vom Hersteller kein Moxifloxacin in Pulverform zur eigenen Dosierung zu beziehen war, ließen sich Versuche mit diesem Antibiotikum nicht durchführen.

5.3 Methodendiskussion

Die Forschung an präventiver Antibiotikabehandlung im Rahmen von ischämischen Hirninsulten zeigt, was bereits im Zusammenhang mit vielen anderen Therapieansätzen festgestellt wurde: Nicht alles, was im Tiermodell erfolgversprechend ist, lässt sich unmittelbar auf den Menschen übertragen. Um zukünftig den Erfolg klinischer Studien zu steigern, ist es wichtig, die präklinische tierexperimentelle Forschung so zu optimieren, dass sie zum einen in ihrem Versuchsaufbau und den untersuchten Spezies der Klinik möglichst nahe kommt und zum anderen geeignete Methoden zur Untersuchung von therapeutischen Effekten verwendet werden (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) 1999; Dirnagl 2006; Braeuninger und Kleinschnitz 2009; Fisher et al. 2009, S. 1999; Baron et al. 2013).

Da in arbeitsgruppeninternen Kurzzeitexperimenten mit 48-stündiger Reperfusion bereits neuroprotektive Effekte einer TLR4-Antikörperapplikation gezeigt werden konnten (s. Kapitel 1.6.3), sollte die Untersuchung von Effekten nach 14-tägiger Reperfusion einen klinisch relevanteren Zeitraum erfassen.

Wie in Kapitel 5.1 diskutiert, ist die auf den ersten Blick bestehende Unwirksamkeit einer langfristigen TLR4-Antikörpertherapie möglicherweise auf eine mangelnde Sensitivität der

verwendeten Methoden zurückzuführen, da in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu Studien mit transgenen Maus- und permanenten Okklusionsmodellen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Gruppen zu detektieren waren.

Die Kombination aus 15-minütiger MCAO und 14-tägiger Reperfusion erfordert eine Reflexion der eingesetzten Methoden zur Untersuchung eines Langzeiteffektes der TLR4-Inhibition im Schlaganfall.

5.3.1 Methoden zur Untersuchung des therapeutischen Effekts

Die von mir verwendeten Methoden kann man grob in zwei Kategorien unterteilen: in Methoden zur Evaluierung eines Effekts auf anatomisch-histologischer Ebene (s. Kapitel 5.3.1.1) und in Methoden zur Erfassung funktioneller und physiologischer Einschränkungen (s. Kapitel 5.3.1.2).

5.3.1.1 Bestimmung des Infarktausmaßes

Die Bestimmung des Schadensausmaßes auf der anatomisch-histologischen Ebene kann grundsätzlich invasiv und nicht-invasiv durchgeführt werden und sollte im Idealfall auf makroskopischer (Infarktvolumen-bezogener) und mikroskopischer (zellulärer) Ebene erfolgen. Noch präzisere Aussagen über postischämische Veränderungen lassen sich auf molekularbiologischer Ebene treffen.

Im Falle der vorliegenden Experimente wurde mit der Untersuchung von makroskopischen und mikroskopischen Infarktparametern von invasiven Verfahren Gebrauch gemacht.

Im Folgenden wäge ich verschiedene Methoden in ihren Vor- und Nachteilen ab, um die von mir verwendeten in ihrer Aussagekraft darzustellen.

Nicht-invasive Bildgebungsverfahren wie die Magnetresonanztomographie, Methoden wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder *Single photon emission computed tomography* (SPECT) bieten den großen Vorteil, am gleichen Tier repetitive Messungen durchzuführen und so Aussagen über die zeitliche Entwicklung des Gehirnschadens und einen möglichen zeitlichen Einfluss des applizierten Therapeutikums treffen zu können (Zille et al. 2012). Allerdings sind der Aufwand und die Kosten für diese Verfahren sehr hoch, zumal nur der makroskopisch sichtbare Schaden bestimmt werden kann, während durch histologische Methoden und biochemische Assays verschiedene, direkt auf den Zelltod übertragbare Parameter untersucht werden können (Zille et al. 2012).

Modelle der milden Ischämie, die mit einem selektiven neuronalen Zelltod einhergehen (Katchanov et al. 2003), erfordern Methoden wie die der histologischen Untersuchung, die sowohl makroskopische als auch mikroskopische Untersuchungen ermöglichen.

Die histologische Bestimmung von Infarktparametern ist weit verbreitet. Wie bei nicht-invasiven Bildgebungsverfahren sind Infarktvolumina auch hier das Maß für makroskopisch sichtbare Unterschiede.

Es stehen eine Reihe an verschiedenen Visualisierungstechniken zur Verfügung. Die von mir verwendete Fluoro-Jade-C-Färbung ist in der Literatur zur Visualisierung von Gewebeschaden in Langzeitversuchen bislang kaum beschrieben, zeigte aber deutliche Infarktareale (s. Abbildung 20). Alternativ eignen sich auch HE- und Nissl-Färbungen zur Bestimmung des Infarktvolumens in Langzeitversuchen (Zille et al. 2012).

Für mikroanatomische Betrachtungen sind immunhistochemische Färbungen sinnvoll (Zille et al. 2012). Diese beliefen sich in meinen Experimenten auf die Immunfluoreszenz-basierte Färbung und Quantifizierung von NeuN-, Iba1- und GFAP-positiven Zellen sowie den Nachweis von Kolo-kalisationen dieser Zellen mit TLR4 durch Doppelfärbungen. Die Quantifizierung von NeuN-positiven Zellen korrelierte mit den Ergebnissen der makroskopischen Bestimmung des Gewebeschadens und zeigte demnach keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Auch im Vergleich der Astrozyten und aktivierten Makrophagen sowie Mikrogliazellen konnte kein Unterschied detektiert werden. Es ist folglich nicht anzunehmen, dass eine TLR4-Blockade einen signifikanten Einfluss auf die gliale bzw. inflammatorische postischämische Reaktion hat.

In Hinblick auf die Zellquantifizierung und Infarktgrößenbestimmung können die von mir verwendeten Methoden als sensitiv betrachtet werden (s. Kap. 4.3.5.2.1).

5.3.1.2 Erfassung funktioneller Defizite

Laut Braeuninger und Kleinschnitz (2009) geht morphologisch intaktes Gewebe nicht immer mit intakten Funktionen einher. Das Fehlen einer linearen Beziehung zwischen Histologie und funktionellen Defiziten wurde auch von Bouët et al. (2007) berichtet. Trotz vergleichbarer Zellzahlen und Infarktvolumina kann also nicht von einer gleichen funktionellen Beeinträchtigung beider Gruppen ausgegangen werden. Hierfür bedarf es der zweiten Methodenkategorie: Es bedarf zusätzlicher funktioneller neurologischer Tests.

Patienten können nach einem Schlaganfall verbal, mimisch und gestisch auch kleinste Einschränkungen äußern. Bei Mäusen und Ratten ist die Detektion von funktionellen Defiziten nicht so einfach (Baron et al. 2013).

Inzwischen stehen je nach Untersuchungszeitraum und Okklusionszeit unterschiedlich sensitive Tests zur Verfügung (Balkaya et al. 2013). Der Bederson-Score, den auch ich verwendet habe, ist nicht sonderlich sensitiv (Baron et al. 2013). Er dient weniger der Einstufung neurologischer Defizite sondern eher der Feststellung eines erfolgten Infarkts auf funktioneller Basis (Bederson et al. 1986). Die mNSS hingegen, das zeigen auch meine Ergebnisse aus dem Vorversuch (Kurzzeitversuch), ist sensitiver und detektiert sowohl motorische als auch sensorische Defizite (Garcia et al. 1995).

Trotzdem sind die meisten sensomotorischen Tests laut Baron et al. (2013) häufig in ihrer langfristigen Aussagekraft eingeschränkt, da Nager die Fähigkeit besitzen, über strategisches Verhalten und Neuroplastizität ihre Defizite zu kompensieren und dadurch im Laufe der Zeit wieder auf ihre Ausgangswerte im Score-Ergebnis zu kommen. Dies konnte auch ich in meinen Experimenten beobachten. Das Einsetzen ausgewählter neurologischer Tests, die sich für die untersuchten Parameter und Zeiträume als zuverlässig erwiesen haben, kann die Sensitivität erhöhen (Balkaya et al. 2013). Für transiente, milde Ischämie Modelle in C57BL/6-Mäusen mit langer Überlebensdauer kommen folgende alternative Verhaltenstests infrage: der *Handedness Test*, der *Adhesive Removal Test*, die Ganganalyse und der *Pole Test* (Bouët et al. 2007; Balkaya et al. 2013). Die Umsetzung dieser Tests erfordert im Gegensatz zur mNSS einen hohen zeitlichen oder personellen Aufwand (*Handedness Test* und *Adhesive Removal Test*) oder ist mit einem hohen finanziellen und technischen Aufwand verbunden (Ganganalyse). Der *Pole Test* erfasst nur motorische Komponenten eines funktionellen Defizits (Bouët et al. 2007; Balkaya et al. 2013). In diesem Hinblick ist die mNSS den aufgeführten Alternativen überlegen, eine Evaluation in Bezug auf ihre Sensitivität in Langzeitversuchen ist allerdings in der Literatur bislang nicht zu finden.

Da - wie in den oberen Abschnitten ausgeführt - histologische Infarktparameter nicht zwangsweise mit funktionellen Defiziten korrelieren (Bouët et al. 2007; Braeuninger und Kleinschnitz 2009) und sich nur wenige Tests langfristig als sensitiv erwiesen haben (Bouët et al. 2007; Balkaya et al. 2013), kann eine Effektivität der TLR4-Inhibition erst dann für milde Ischämien ausgeschlossen werden, wenn auch durch etablierte sensitive Verhaltenstests kein Vorteil für behandelte Tiere ersichtlich ist.

5.3.2 Etablierung einer neuen Okklusionszeit für Langzeitversuche

Auch wenn eine Okklusionszeit von 15 Minuten bislang in der Literatur anderer Arbeitsgruppen kaum beschrieben ist, ist nach einer Reperfusionzeit von zwei Wochen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch eine ischämische Schädigung des untersuchten Gehirngewebes deutlich erkennbar. Somit etablierte ich durch die vorliegende Arbeit eine neue Okklusionszeit für milde Infarkte im Langzeit-MCAO-Modell, an das Krey et al. (2015) arbeitsgruppenintern ihre Untersuchungen über einen siebentägigen Reperusionszeitraum zu einer postischämischen Neuroprotektion durch Sirtuin-2-Defizienz anlehnten.

Die in der Literatur häufig verwendete Okklusionszeit von 30 Minuten war aufgrund der hohen Mortalität zu Beginn der Langzeitexperimente ethisch nicht vertretbar.

5.3.3 Reperusionszeitraum: eine Annäherung an die Klinik

Im klinischen Alltag werden zur Beurteilung des Infarktausmaßes ebenfalls funktionelle und histologische Parameter erhoben. Während das durch ein MRT feststellbare *Diffusion-weighted-imaging/perfusion-weighted-imaging-mismatch* (DWI/PWI-Mismatch) Aufschluss über das Verhältnis von Infarktareal und *Penumbra* gibt und entscheidend für die Sinnhaftigkeit einer Reperfusionstherapie ist (Parsons et al. 2010), sind für die Beurteilung des Therapieerfolgs vor allem neurologische Untersuchungen ausschlaggebend. Im Gegensatz zu den meisten tierexperimentellen Studien wird der Effekt einer Therapie in klinischen Studien erst nach 3 - 12 Monaten evaluiert (Baron et al. 2013). Demnach ist es für eine Translation präklinischer Studien auf klinische Kontexte wichtig, auch im tierexperimentellen Modell lange Beobachtungszeiträume zu wählen. Diese Überlegung liegt meiner Arbeit zugrunde. Die Komplikationen, die sich aus der Langzeitbetrachtung ergaben, und das Fehlen vergleichbarer Studien erklären womöglich, warum viele experimentelle Schlaganfallarbeitsgruppen entgegen anders lautender Empfehlungen weiterhin mit Kurzzeitmodellen arbeiten (Baron et al. 2013). Eine stärkere Auseinandersetzung mit der Problematik der Langzeitversuche nicht nur innerhalb einzelner Arbeitsgruppen, sondern auch in der Öffentlichkeit in Form von Publikationen und Diskussionen kann dazu beitragen, dass durch die Entwicklung eines allgemein umsetzbaren Langzeit-MCAO-Modells die tierexperimentelle Forschung ihrer präklinischen Ausrichtung gerecht wird und einen sinnvollen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapiestrategien leisten kann. Meine Arbeit bietet Ansatzpunkte für eine solche Auseinandersetzung.

5.4 Schlussfolgerung: Relevanz der Ergebnisse

Nach milder Ischämie und einer zweiwöchigen Reperfusionzeit konnte durch eine Inhibition des TLR4 in dieser Arbeit kein signifikanter neuroprotektiver Effekt festgestellt werden. Allerdings ließen sich die in einem transgenen Tiermodell beschriebenen schädlichen Langzeiteffekte der TLR-Inhibition auch nicht nachweisen (Bohacek et al. 2012).

Aufgrund der Komplikationen durch eine hohe postischämische Mortalität, den resultierenden kleinen Gruppengrößen sowie der Schwierigkeit, langfristige funktionelle Defizite festzustellen, ist die klinische Aussagekraft dieser Ergebnisse eingeschränkt. Dennoch können sie als Grundlage für weitere Modellentwicklungen dienen: Eine Modifikation des Modells dieser Arbeit ist beispielsweise durch den Einsatz einer dem Erregerspektrum besser angepassten Antibiose und sensitiverer Verhaltenstests denkbar.

Eine klinische Prüfung in Hinblick auf das therapeutische Potenzial der TLR4-Inhibition sollte nicht vor dem Abschluss entsprechender experimenteller Studien durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Der Schlaganfall zählt zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Dies ist auch dadurch bedingt, dass die Therapiemöglichkeiten und Zeitfenster für therapeutische Interventionen eingeschränkt sind. Als Ansatzpunkt für neuroprotektive Therapiestrategien zählt die *Penumbra*, in der das Gehirngewebe erst durch postischämische Prozesse Schaden nimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der Antikörper-induzierten Inhibition des *Toll-like receptor 4* (TLR4) nach milder Ischämie und einem Reperusionszeitraum von zwei Wochen untersucht. Der TLR4 ist durch die Expressierung auf residenten zerebralen Zellen wie kortikalen Neuronen, Astrozyten und Mikroglia an der postischämischen Immunreaktion beteiligt. Neuroprotektive Effekte der TLR4-Inhibitor ließen sich bereits in verschiedenen Kurzzeitstudien nach schwerem Infarkt nachweisen. Vergleichbare Effekte der TLR4-Defizienz über einen längeren Betrachtungszeitraum sind bislang nur in transgenen Tiermodellen nachgewiesen worden.

In dieser Arbeit erfolgte die Infarktmetrie sowie die auf immunhistochemischen Färbungen basierende Quantifizierung von NeuN-, Iba1- und GFAP-positiven Zellen nach 15-minütiger MCAO mit intraarterieller Applikation des TLR4/MD2-Antikörpers MTS510 oder PBS und einer Reperusionszeit von 14 Tagen.

Signifikante Unterschiede zwischen den TLR4-Antikörper-behandelten Mäusen und den Mäusen der Kontrollgruppe konnten weder in Bezug auf Infarktvolumina noch auf die untersuchten Zellzahlen festgestellt werden. Auch in den eingesetzten Neuroscores, dem Bederson-Score sowie der *modified Neurological Score Scale* (mNSS), waren keine signifikant unterschiedlichen sensomotorischen Defizite detektierbar.

Durch Änderungen des Versuchsaufbaus konnte die postischämische Mortalität zwar gesenkt werden, dennoch verstarben auch unter einer postoperativen antibiotischen Behandlung so viele Tiere, dass eindeutige Rückschlüsse auf das therapeutische Potenzial der TLR4-Inhibition erschwert wurden.

Aufgrund der therapeutisch vielversprechenden Langzeitstudien in transgenen Mausmodellen sollten auf Grundlage dieses Versuchs weitere Modifikationen durch sensitivere Verhaltenstests und eine gezielte antibiotische Behandlung vorgenommen werden, bevor dieser Therapieansatz eine klinische Prüfung erfährt.

7 Anhang

7.1 Bestätigung der fachlichen Eignung

UNIVERSITÄTSMEDIZIN GÖTTINGEN **UMG**

Universitätsmedizin Göttingen, 37099 Göttingen
Tierschutzbüro, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen

Tierschutzbeauftragter
Prof. Dr. rer. nat. Hubertus Jarry

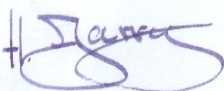
Tierschutzbüro
Marlis Seipke

37099 Göttingen **Briefpost**
Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen **Adresse**
0551 / 39-7080 **Telefon**
0551 / 39-9223 **Fax:**
tierschutz@med.uni-goettingen.de **E-mail**
MS Aktenzeichen
16.01.2014 **Datum**

Bestätigung der fachlichen Eignung

Hiermit bestätige ich, dass die Studierende Frau Lena Andresen, Klinik für Neurologie, Universitätsmedizin Göttingen, die fachliche Eignung zur selbstständigen Durchführung folgender operativer Eingriffe/Behandlungen in Mäusen, inklusive der hierzu notwendigen Narkose, besitzt:

- Fokale zerebrale Ischämie (MCAO) unter Isoflurannarkose
- Injektionen i.p., s.c. und intranasale Applikation
- Wiegen, Beurteilung des Gesundheitszustands der Tiere sowie Erhebung eines neurologischen Scores
- Tötung durch Dekapitation unter tiefer Narkose



Prof. Dr. H. Jarry
Tierschutzbeauftragter der UMG

Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität Stiftung Öffentlichen Rechts Vorstand Prof. Dr. Heyo K. Kroemer (Forschung und Lehre, Sprecher des Vorstands) Dr. Martin Siess (Krankenversorgung) Dr. Sebastian Freytag (Wirtschaftsführung und Administration)
Sparkasse Göttingen (260 500 01) Kto: 448, IBAN: DE55 2605 0001 0000 0004 48, BIC: NOLADE21G0E

7.2 Zertifikat über den FELASA-B-Kurs

Zertifikat / Certificate

UNIVERSITÄTSMEDIZIN
GÖTTINGEN : UMG

Lena Andresen

geboren am / date of birth 27.05.1991

hat im Wintersemester 2013/2014

erfolgreich einen **40-stündigen Kurs** in Versuchstierkunde den FELASA-B-Richtlinien entsprechend abgeschlossen. Der Kurs wurde von der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland, durchgeführt.

successfully completed a **40-hours course** in Laboratory Animal Science according to the recommendations of the FELASA (Category B). The course was organized by the Central Animal Facility, University Medical Center Göttingen, Germany.

Göttingen,

07.02.2014

Schraepler
Dr. Anke Schraepler

Der Kurs beinhaltet folgende Themen:

Gesetzliche Voraussetzungen

- Übersicht über die nationale Gesetzgebung hinsichtlich des Einsatzes von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken; Genehmigungsverfahren; Kontrolle und Überwachung

Biologie der Versuchstiere

- Biologie der Versuchstiere Maus, Ratte und Kaninchen (vergleichende Anatomie und Physiologie; Pflege und Haltung; Reproduktion und Zucht; Stress und Wohlbefinden; Ernährung)
- Ethologie der Versuchstiere Maus, Ratte und Kaninchen
- Umgang mit Versuchstieren
- Genetische Standardisierung; Wechselwirkungen zwischen Genotyp und Umwelt; Inzuchtstämme; Auszuchtstämme; Herstellung und Zucht transgener Tiere; Genetische Charakterisierung; genetische Qualitätskontrolle
- Erkennen, Bewerten und Behandeln von Schmerzen und Leiden bei Versuchstieren
- Standardisierungen in der Versuchstierhaltung; Environmental improvement

Mikrobiologie und Krankheiten

- Gesundheitsüberwachung und Krankheitsprophylaxe; Quarantäne; Hygiene
- Krankheiten der Versuchstiere; Einfluß von Krankheiten auf Versuchsergebnisse

Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen

- die 3Rs; Beispiele für Ersatzmethoden zu Tierversuchen

Anästhesie und Analgesie

- Methoden und Wirkungsweisen verschiedener Anästhesien; Narkose- und Schmerzmittel

experimentelle Methoden

- Einführung in die Chirurgie
- nicht-operative Eingriffe wie Injektionen, orale Verabreichung, Blutentnahmen, Sammeln von Harn- und Kotproben
- operative Eingriffe: Ovariectomie Ratte und Vasectomie Maus
- tierschutzgerechte Euthanasie; chemische und physikalische Tötungsmethoden

The course contains these main topics:

Legislation

- Survey of the national legislation regarding animal use for scientific purposes; licensing; inspection

Biology and husbandry of laboratory animals

- Biology of laboratory animals (comparative anatomy and physiology of mice, rats, and rabbits; care and housing; reproduction and breeding; animal well being and stress; nutrition)
- Ethology of rats, mice and rabbits
- Handling of laboratory animals
- Genetic standardization; genotype - environment interactions; inbred strains; outbred strains; creation and breeding of transgenic animals; genetic characterization; genetic quality control
- Recognition, assessment and control of pain and suffering in laboratory animals
- Standardization in laboratory animal facilities; Environmental improvement

Mikrobiology and diseases

- Health monitoring and prevention of diseases; quarantine, hygiene
- Diseases of laboratory animals; Impact of diseases on experimental results

Alternatives to animal use

- The 3R's; Examples for alternatives to animal use

Anesthesia, analgesia, and experimental procedures

- Effectiveness of different methods of anesthesia; narcotics and analgesics

Experimental methods

- Introduction to surgery
- Non-surgical procedures such as applications, oral dosing; collection of blood, urine and feces
- Surgical procedures: ovariectomy rat and vasectomy mouse
- Humane euthanasia; chemical and physical methods of killing

7.3 Protokoll für die Herstellung von Citratpuffer

6 g Zitronensäure werden mit 3 l deioniertem H₂O gelöst. Der pH-Wert wird auf 6,0 eingestellt.

7.4 Protokoll für die Herstellung von TBS (1 l)

In 800 ml dH₂O werden gelöst:

8,8 g Natriumchlorid (NaCl)

2,4 g Tris-Base

Im Anschluss wird das Volumen auf 1 l adjustiert und der pH-Wert mit HCl auf 7,6 eingestellt.

7.5 Protokoll für die Herstellung von PBS (1 l)

In 800 ml dH₂O werden gelöst:

8g NaCl

0,2 g KCl

2,16 g Na₂HPO₄

0,2 g K₂HPO₄

Im Anschluss wird das Volumen auf 1 l adjustiert und der pH-Wert mit HCl auf 7,4 eingestellt.

7.6 Berechnung der Moxifloxacinmenge

Grundlage dieser Berechnung ist die pharmakologisch frei verfügbare Moxifloxacin-Infusionslösung mit einer Konzentration von 400 mg/250 ml.

Bei einer zu applizierenden Dosis von 100 mg/ kg Körpergewicht und einer durchschnittlichen 25 g schweren Maus wird also für jede Applikation eine Moxifloxacin-Dosis von 2,5 mg benötigt.

Diese Dosis kann mit der Infusionslösung nur erreicht werden, wenn der Maus jedes Mal 15,625 ml Flüssigkeit ins Peritoneum appliziert werden. Die maximale intraperitoneale Applikationsdosis aber beträgt 1,25 ml (Weiss et al. 2003).

8 Literaturverzeichnis

- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE (1993): Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke J Cereb Circ* 24, 35–41
- Aderem A, Ulevitch RJ (2000): Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, et al. (2007): Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13, 1050–1059
- Arnold G, Beier H, Herrmann M, Kretschmann H-J, Kühnel W, Schiebler T, Schmidt W, Steiniger B, Winckler J, van der Zypen E, Zilles K: Zentralnervensystem. In: Schiebler T, Schmidt W, Zilles K (Hrsg.): *Anatomie*. 8. Auflage; Springer-Verlag, o.O. 1999, 744–747
- Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH (2001): Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21, 7724–7732
- Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA (1977): Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8, 51–57
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L (1981): Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723–725
- Balkaya M, Kröber JM, Rex A, Endres M (2013): Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc 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?. Meeting report of the ESC-BRAIN joint symposium held in London and Shanghai in May 2013. *Cerebrovasc Dis Basel Switz* 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 J Cereb Circ* 17, 472–476
- Bell MT, Puskas F, Agoston VA, Cleveland JC, Freeman KA, Gamboni F, Herson PS, Meng X, Smith PD, Weyant MJ, et al. (2013): Toll-like receptor 4-dependent microglial activation mediates spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 128, S152–156
- 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

- Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, Schonewille WJ, Vos JA, Nederkoorn PJ, Wermer MJH, et al. (2015): A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 372, 11–20
- Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F (1988): The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke J Cereb Circ* 19, 1083–1092
- Bohacek I, Cordeau P, Lalancette-Hébert M, Gorup D, Weng Y-C, Gajovic S, Kriz J (2012): Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury. *J Neuroinflammation* 9, 191
- Bouët V, Freret T, Toutain J, Divoux D, Boulouard M, Schumann-Bard P (2007): Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp Neurol* 203, 555–567
- Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I (2003): Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 43, 281–291
- Braeuninger S, Kleinschnitz C (2009): Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Exp Transl Stroke Med* 1, 8
- Brott T, Adams HP, Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, Spilker J, Holleran R, Eberle R, Hertzberg V (1989): Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 20, 864–870
- Busto R, Ginsberg MD (1985): Graded focal cerebral ischemia in the rat by unilateral carotid artery occlusion and elevated intracranial pressure: hemodynamic and biochemical characterization. *Stroke J Cereb Circ* 16, 466–476
- Campbell BCV, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, Yan B, Dowling RJ, Parsons MW, Oxley TJ, et al. (2015): Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med* 372, 1009–1018
- Cao C-X, Yang Q-W, Lv F-L, Cui J, Fu H-B, Wang J-Z (2007): Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 509–514
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2007): Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115, 1599–1608
- Chen Y, Swanson RA (2003): Astrocytes and Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 137–149
- Chen Y, Vartiainen NE, Ying W, Chan PH, Koistinaho J, Swanson RA (2001): Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *J Neurochem* 77, 1601–1610
- Chen Y, Zhu W, Zhang W, Libal N, Murphy SJ, Offner H, Alkayed NJ (2015): A novel mouse model of thromboembolic stroke. *J Neurosci Methods* 256, 203–211
- Choi Y-S, Cho H-Y, Hoyt KR, Naegele JR, Obrietan K (2008): IGF-1 receptor-mediated ERK/MAPK signaling couples status epilepticus to progenitor cell proliferation in the subgranular layer of the dentate gyrus. *Glia* 56, 791–800
- Cotrina ML, Kang J, Lin JH, Bueno E, Hansen TW, He L, Liu Y, Nedergaard M (1998): Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 18, 2520–2537

- Cui W, Allen ND, Skynner M, Gusterson B, Clark AJ (2001): Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia* 34, 272–282
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J (2005): Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1, 112–119
- Deitmer JW, Rose CR (1996): pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol* 48, 73–103
- Denes A, Vidyasagar R, Feng J, Narvainen J, McColl BW, Kauppinen RA, Allan SM (2007): Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 27, 1941–1953
- DGN-Leitlinie 2012 Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012
- Dirnagl U (2006): Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 26, 1465–1478
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391–397
- Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS, Harms H, Meisel C, Ziemssen T, Prass K, Meisel A (2007): Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke J Cereb Circ* 38, 770–773
- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (2008): Stroke. *The Lancet* 371, 1612–1623
- Dringen R, Gebhardt R, Hamprecht B (1993): Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res* 623, 208–214
- Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW (1996): Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 16, 195–201
- Encarnacion A, Horie N, Keren-Gill H, Bliss TM, Steinberg GK, Shamloo M (2011): Long-term behavioral assessment of function in an experimental model for ischemic stroke. *J Neurosci Methods* 196, 247–257
- Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V (2011): Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp JoVE*
- Finlayson O, Kapral M, Hall R, Asllani E, Selchen D, Saposnik G, Canadian Stroke Network, Stroke Outcome Research Canada (SORCan) Working Group (2011): Risk factors, inpatient care, and outcomes of pneumonia after ischemic stroke. *Neurology* 77, 1338–1345
- Fisher M, Garcia JH (1996): Evolving stroke and the ischemic penumbra. *Neurology* 47, 884–888
- 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 J Cereb Circ* 40, 2244–2250
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT (2003): LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198, 1043–1055

- Forster C, Clark HB, Ross ME, Iadecola C (1999): Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathol (Berl)* 97, 215–220
- 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 KF, Hu XJ (1995): Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke J Cereb Circ* 26, 627–634; discussion 635
- Gay NJ, Keith FJ (1991): Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355–356
- Gelderblom M, Leypoldt 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 J Cereb Circ* 40, 1849–1857
- Gesuede R, Kohama SG, Stenzel-Poore MP (2014): Toll-like receptors and ischemic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 73, 378–386
- Gosemann JH, van Griensven M, Barkhausen T, Kobbe P, Thobe BM, Haasper C, Pape HC, Krettek C, Hildebrand F, Frink M (2010): TLR4 influences the humoral and cellular immune response during polymicrobial sepsis. *Injury* 41, 1060–1067
- Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, Roy D, Jovin TG, Willinsky RA, Sapkota BL, et al. (2015): Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med* 372, 1019–1030
- Grau AJ, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, Glahn J, Brandt T, Hacke W, Diener H-C (2001): Risk Factors, Outcome, and Treatment in Subtypes of Ischemic Stroke The German Stroke Data Bank. *Stroke* 32, 2559–2566
- Gray H, Lewis WH: *Anatomy of the human body*. 20. Auflage; Lea & Febinger, Philadelphia und New York 1918, Abbildung 516, o.S.
- Grønberg NV, Johansen FF, Kristiansen U, Hasseldam H (2013): Leukocyte infiltration in experimental stroke. *J Neuroinflammation* 10, 115
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, et al. (2008): Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359, 1317–1329
- Hanisch U-K, Johnson TV, Kipnis J (2008): Toll-like receptors: roles in neuroprotection? *Trends Neurosci* 31, 176–182
- Hansen AJ (1985): Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65, 101–148
- 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
- Harms H, Prass K, Meisel C, Klehmet J, Rogge W, Drenckhahn C, Göhler J, Bereswill S, Göbel U, Wernecke KD, et al. (2008): Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *PLoS One* 3, e2158

- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988): The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269–279
- Hatano S (1976): Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report. *Bull World Health Organ* 54, 541–553
- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X (2009): Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α . *Cell* 137, 1100–1111
- He S, Liang Y, Shao F, Wang X (2011): Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20054–20059
- Heuschmann P, Busse O, Wagner M, Endres M, Villringer A, Röther J, Kolominsky-Rabas P, Berger K (2010): Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Aktuelle Neurol* 37, 333–340
- Hornig T, Barton GM, Medzhitov R (2001): TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2, 835–841
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S (1999): Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol Baltim Md* 162, 3749–3752
- Hossmann K-A (2008): Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 55, 257–270
- Hossmann KA, Schuier FJ (1980): Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations. *Stroke* 11, 583–592
- Hua F, Ha T, Ma J, Li Y, Kelley J, Gao X, Browder IW, Kao RL, Williams DL, Li C (2007): Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J Immunol Baltim Md* 178, 7317–7324
- Hua F, Ma J, Ha T, Kelley JL, Kao RL, Schweitzer JB, Kalbfleisch JH, Williams DL, Li C (2009): Differential Roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Brain Res* 1262, 100–108
- Hua F, Tang H, Wang J, Prunty MC, Hua X, Sayeed I, Stein DG (2015): TAK-242, an antagonist for Toll-like receptor 4, protects against acute cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*
- Huang L, Wu Z-B, Zhuge Q, Zheng W, Shao B, Wang B, Sun F, Jin K (2014): Glial scar formation occurs in the human brain after ischemic stroke. *Int J Med Sci* 11, 344–348
- Hudgins WR, Garcia JH (1970): Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey: a technique for experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies. *Stroke J Cereb Circ* 1, 107–111
- Iadecola C, Anrather J (2011): The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17, 796–808
- Iadecola C, Salkowski CA, Zhang F, Aber T, Nagayama M, Vogel SN, Ross ME (1999): The transcription factor interferon regulatory factor 1 is expressed after cerebral ischemia and contributes to ischemic brain injury. *J Exp Med* 189, 719–727

- Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, Zhao X, Nagayama M, Araki E, Morham S, Ross ME (2001): Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-d-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 98, 1294–1299
- Jackson C, Sudlow C (2005): Comparing risks of death and recurrent vascular events between lacunar and non-lacunar infarction. *Brain J Neurol* 128, 2507–2517
- Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, et al. (2005): Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med* 11, 1173–1179
- Jin R, Yang G, Li G (2010): Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol* 87, 779–789
- Jung DY, Lee H, Jung B-Y, Ock J, Lee M-S, Lee W-H, Suk K (2005): TLR4, but Not TLR2, Signals Autoregulatory Apoptosis of Cultured Microglia: A Critical Role of IFN- β as a Decision Maker. *J Immunol* 174, 6467–6476
- Karwoski CJ, Lu HK, Newman EA (1989): Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal Müller (glial) cells. *Science* 244, 578–580
- Katayama Y, Tamura T, Becker DP, Tsubokawa T (1992): Early cellular swelling during cerebral ischemia in vivo is mediated by excitatory amino acids released from nerve terminals. *Brain Res* 577, 121–126
- Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Winter B, Brück W, Dirnagl U, Veh RW, Endres M (2003): Selective Neuronal Vulnerability Following Mild Focal Brain Ischemia in the Mouse. *Brain Pathol* 13, 452–464
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999): Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115–122
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S (2001): Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol Baltim Md* 167, 5887–5894
- Kiefer R, Lindholm D, Kreutzberg GW (1993): Interleukin-6 and Transforming Growth Factor- β 1 mRNAs are Induced in Rat Facial Nucleus Following Motoneuron Axotomy. *Eur J Neurosci* 5, 775–781
- Kilic E, Hermann DM, Hossmann KA (1998): A reproducible model of thromboembolic stroke in mice. *Neuroreport* 9, 2967–2970
- Kofler J, Hattori K, Sawada M, DeVries AC, Martin LJ, Hurn PD, Traystman RJ (2004): Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *J Neurosci Methods* 136, 33–44
- Kohler E, Prentice DA, Bates TR, Hankey GJ, Claxton A, van Heerden J, Blacker D (2013): Intravenous minocycline in acute stroke: a randomized, controlled pilot study and meta-analysis. *Stroke J Cereb Circ* 44, 2493–2499
- Krey L, Luhder F, Kusch K, Czech-Zechmeister B, Konnecke B, Outeiro TF, Trendelenburg G (2015): Knockout of silent information regulator 2 (SIRT2) preserves neurological function after experimental stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*
- Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK (1966): Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29, 768–787

- Larsen PH, Holm TH, Owens T (2007): Toll-like receptors in brain development and homeostasis. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ* 2007, pe47
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT (2004): TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5, 190–198
- Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, Brott TG, Toni D, Grotta JC, Albers GW, Kaste M, Marler JR, Hamilton SA, et al. (2010): Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* 375, 1695–1703
- Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2002): The Toll-Like Receptor TLR4 Is Necessary for Lipopolysaccharide-Induced Oligodendrocyte Injury in the CNS. *J Neurosci* 22, 2478–2486
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003): Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8514–8519
- Leist M, Nicotera P (1998): Apoptosis, Excitotoxicity, and Neuropathology. *Exp Cell Res* 239, 183–201
- Leitlinie ischämischer Schlaganfall s. DGN-Leitlinie 2012
- Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, Medzhitov RM, Beg AA (2001): An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 166, 7128–7135
- Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Zhang Z (2000): Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 20, 1311–1319
- Lin Y-C, Chang Y-M, Yu J-M, Yen J-H, Chang J-G, Hu C-J (2005): Toll-like receptor 4 gene C119A but not Asp299Gly polymorphism is associated with ischemic stroke among ethnic Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* 180, 305–309
- 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. *Mol Brain Res* 32, 116–124
- Lipton P (1999): Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol Rev* 79, 1431–1568
- Liu S, Zhen G, Meloni BP, Campbell K, Winn HR (2009): RODENT STROKE MODEL GUIDELINES FOR PRECLINICAL STROKE TRIALS (1ST EDITION). *J Exp Stroke Transl Med* 2, 2–27
- Lowry OH, Passonneau JV, Hasselberger FX, Schulz DW (1964): Effect of Ischemia on Known Substrates and Cofactors of the Glycolytic Pathway in Brain. *J Biol Chem* 239, 18–30
- 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
- Marsh B, Stevens SL, Packard AEB, Gopalan B, Hunter B, Leung PY, Harrington CA, Stenzel-Poore MP (2009): Systemic Lipopolysaccharide Protects the Brain from Ischemic Injury by

- Reprogramming the Response of the Brain to Stroke: A Critical Role for IRF3. *J Neurosci* 29, 9839–9849
- McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR (1999): The Chondroitin Sulfate Proteoglycans Neurocan and Phosphacan Are Expressed by Reactive Astrocytes in the Chronic CNS Glial Scar. *J Neurosci* 19, 10778–10788
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA (1997): A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA (1998): MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2, 253–258
- Meisel C, Prass K, Braun J, Victorov I, Wolf T, Megow D, Halle E, Volk H-D, Dirnagl U, Meisel A (2004): Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. *Stroke J Cereb Circ* 35, 2–6
- Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U (2005): Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6, 775–786
- Moraga A, Pradillo JM, Cuartero MI, Hernández-Jiménez M, Osés M, Moro MA, Lizasoain I (2014): Toll-like receptor 4 modulates cell migration and cortical neurogenesis after focal cerebral ischemia. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 28, 4710–4718
- Morgan SC, Taylor DL, Pocock JM (2004): Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta–Notch signalling cascades. *J Neurochem* 90, 89–101
- Morrison HW, Filosa JA (2013): A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation* 10, 4
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Ferranti S de, Després J-P, Fullerton HJ, Howard VJ, et al. (2015): Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation* 131, e29–e322
- Mumenthaler M, Mattle H: Ischämische Schlaganfälle. In: *Neurologie*. 12. Auflage; George Thieme Verlag, Stuttgart 2008, 121–170
- Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T (2001): Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res* 65, 322–331
- Nederkoorn PJ, Westendorp WF, Hooijenga IJ, de Haan RJ, Dippel DWJ, Vermeij FH, Dijkgraaf MGW, Prins JM, Spanjaard L, van de Beek D (2011): Preventive antibiotics in stroke study: rationale and protocol for a randomised trial. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc* 6, 159–163
- Neely MD, Gesemann M (1994): Disruption of microfilaments in growth cones following depolarization and calcium influx. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 14, 7511–7520
- Neu HC, Meropol NJ, Fu KP (1981): Antibacterial activity of ceftriaxone (Ro 13-9904), a beta-lactamase-stable cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother* 19, 414–423
- Newton K, Dugger DL, Wickliffe KE, Kapoor N, de Almagro MC, Vucic D, Komuves L, Ferrando RE, French DM, Webster J, et al. (2014): Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science* 343, 1357–1360

- Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H (2000): Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol Baltim Md* 1950 164, 558–561
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF (2001): The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276, 10229–10233
- Olson JK, Miller SD (2004): Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol Baltim Md* 1950 173, 3916–3924
- O’Neill LA, Kaltschmidt C (1997): NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20, 252–258
- O’Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG (2013): The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 453–460
- Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P (1992): Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 32 Suppl, S33–42
- Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T (2003): TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4, 161–167
- Ozinsky A, Smith KD, Hume D, Underhill DM (2000a): Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 6, 393–396
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A (2000b): The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13766–13771
- Parsons MW, Christensen S, McElduff P, Levi CR, Butcher KS, De Silva DA, Ebinger M, Barber PA, Bladin C, Donnan GA, et al. (2010): Pretreatment diffusion- and perfusion-MR lesion volumes have a crucial influence on clinical response to stroke thrombolysis. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 30, 1214–1225
- Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, Macleod M, Mignini LE, Jayaram P, Khan KS (2007): Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ* 334, 197
- Pfefferkorn T, Holtmannspötter M, Schmidt C, Bender A, Pfister H-W, Straube A, Mayer TE, Brückmann H, Dichgans M, Fesl G (2010): Drip, ship, and retrieve: cooperative recanalization therapy in acute basilar artery occlusion. *Stroke J Cereb Circ* 41, 722–726
- Planas AM, Soriano MA, Berruezo M, Justicia C, Estrada A, Pitarch S, Ferrer I (1996): Induction of Stat3, a signal transducer and transcription factor, in reactive microglia following transient focal cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci* 8, 2612–2618
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, et al. (1998): Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* 282, 2085–2088
- Pradillo JM, Fernández-López D, García-Yébenes I, Sobrado M, Hurtado O, Moro MA, Lizasoain I (2009): Toll-like receptor 4 is involved in neuroprotection afforded by ischemic preconditioning. *J Neurochem* 109, 287–294
- Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, et al. (2003): Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial

- infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med* 198, 725–736
- Pulsinelli WA, Brierley JB (1979): A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke J Cereb Circ* 10, 267–272
- Qureshi ST, Larivière L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D (1999): Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189, 615–625
- Rami A, Bechmann I, Stehle JH (2008): Exploiting endogenous anti-apoptotic proteins for novel therapeutic strategies in cerebral ischemia. *Prog Neurobiol* 85, 273–296
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998): A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci* 95, 588–593
- Rolls A, Shechter R, Schwartz M (2009): The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci* 10, 235–241
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, et al. (2005): Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433, 73–77
- Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, Weih M, Iurato L, Meisel A, Dirnagl U (1998): Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* 254, 117–120
- Sakai H, Sheng H, Yates RB, Ishida K, Pearlstein RD, Warner DS (2007): Isoflurane provides long-term protection against focal cerebral ischemia in the rat. *Anesthesiology* 106, 92–99; discussion 8–10
- Salford LG, Plum F, Siesjö BK (1973a): Graded hypoxia-oligemia in rat brain. I. Biochemical alterations and their implications. *Arch Neurol* 29, 227–233
- Salford LG, Plum F, Brierley JB (1973b): Graded hypoxia-oligemia in rat brain. II. Neuropathological alterations and their implications. *Arch Neurol* 29, 234–238
- Saposnik G, Hill MD, O'Donnell M, Fang J, Hachinski V, Kapral MK, Registry of the Canadian Stroke Network for the Stroke Outcome Research Canada (SORCan) Working Group (2008): Variables associated with 7-day, 30-day, and 1-year fatality after ischemic stroke. *Stroke J Cereb Circ* 39, 2318–2324
- Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R (2003): Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 183, 25–33
- Schilling M, Besselmann M, Müller M, Strecker JK, Ringelstein EB, Kiefer R (2005): Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: An investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 196, 290–297
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L (2005): Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 1035, 24–31
- Schousboe A, Sarup A, Bak LK, Waagepetersen HS, Larsson OM (2004): Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Int* 45, 521–527

- Schworer SA, Smirnova II, Kurbatova I, Bagina U, Churova M, Fowler T, Roy AL, Degterev A, Poltorak A (2014): Toll-like receptor-mediated down-regulation of the deubiquitinase cylindromatosis (CYLD) protects macrophages from necroptosis in wild-derived mice. *J Biol Chem* 289, 14422–14433
- Shibata M, Ohtani R, Ihara M, Tomimoto H (2004): White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke J Cereb Circ* 35, 2598–2603
- Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, Yoshimura A (2012): Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol* 3, 132
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M (1999): MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189, 1777–1782
- Silver IA, Erecińska M (1990): Intracellular and extracellular changes of [Ca²⁺] in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *J Gen Physiol* 95, 837–866
- Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) (1999): Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke J Cereb Circ* 30, 2752–2758
- Suzuki Y, Hattori K, Hamanaka J, Murase T, Egashira Y, Mishiro K, Ishiguro M, Tsuruma K, Hirose Y, Tanaka H, et al. (2012): Pharmacological inhibition of TLR4-NOX4 signal protects against neuronal death in transient focal ischemia. *Sci Rep* 2, 896
- 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 Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 10, 290–293
- Symon L, Branston NM, Chikovani O (1979): Ischemic brain edema following middle cerebral artery occlusion in baboons: relationship between regional cerebral water content and blood flow at 1 to 2 hours. *Stroke* 10, 184–191
- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981): Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 1, 53–60
- Tang S-C, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, et al. (2007): Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13798–13803
- Thöne-Reineke C, Neumann C, Namsolleck P, Schmerbach K, Krikov M, Scheffé JH, Lucht K, Hörtnagl H, Godes M, Müller S, et al. (2008): The beta-lactam antibiotic, ceftriaxone, dramatically improves survival, increases glutamate uptake and induces neurotrophins in stroke. *J Hypertens* 26, 2426–2435
- Trendelenburg G, Dirnagl U (2005): Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia* 50, 307–320
- Trotta T, Porro C, Calvello R, Panaro MA (2014): Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *J Neuroimmunol* 268, 1–12
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H (2002): HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277, 15107–15112

- Venero JL, Vizuete ML, Machado A, Cano J (2001): Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 63, 321–336
- Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, Akira S, Kelly KM, Reeves WH, Bauer S, Krieg AM (2005): Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* 202, 1575–1585
- Wang X, Yue T-L, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ (1994): Concomitant cortical expression of TNF- α and IL-1 β mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 23, 103–114
- Wang Y-C, Lin S, Yang Q-W (2011): Toll-like receptors in cerebral ischemic inflammatory injury. *J Neuroinflammation* 8, 134
- Weiss J, Maeß J, Nebendahl K: *Versuchsplanung und -durchführung. In: Haus- und Versuchstierpflege. 2. Auflage; Enke Verlag, Stuttgart 2003, 351*
- Westendorp WF, Nederkoorn PJ, Vermeij J-D, Dijkgraaf MG, de Beek D van (2011): Post-stroke infection: A systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol* 11, 110
- Westendorp WF, Vermeij J-D, Zock E, Hooijenga IJ, Kruyt ND, Bosboom HJLW, Kwa VIH, Weisfelt M, Remmers MJM, ten Houten R et al. (2015): The Preventive Antibiotics in Stroke Study (PASS): a pragmatic randomised open-label masked endpoint clinical trial. *Lancet Lond Engl* 385, 1519–1526
- Wu VW, Nishiyama N, Schwartz JP (1998): A culture model of reactive astrocytes: increased nerve growth factor synthesis and reexpression of cytokine responsiveness. *J Neurochem* 71, 749–756
- Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2002): Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol Baltim Md* 169, 6668–6672
- Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K (1995): Interleukin-1 as a Pathogenetic Mediator of Ischemic Brain Damage in Rats. *Stroke* 26, 676–681
- Zhang Y, Fan S, Yao Y, Ding J, Wang Y, Zhao Z, Liao L, Li P, Zang F, Teng G-J (2012): In Vivo Near-Infrared Imaging of Fibrin Deposition in Thromboembolic Stroke in Mice. *PLoS ONE* 7
- Ziegler G, Freyer D, Harhausen D, Khojasteh U, Nietfeld W, Trendelenburg G (2011): Blocking TLR2 in vivo protects against accumulation of inflammatory cells and neuronal injury in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 757–766
- Zille M, Farr TD, Przesdzing I, Müller J, Sommer C, Dirnagl U, Wunder A (2012): Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 213–231

8.1 Internetquellen

<http://www.bartleby.com/107/146.html>; Zugriff am 11.11.2015

<http://www.dgn.org/leitlinien/2310-ll-22-2012-akuttherapie-des-ischamischen-schlaganfalls>;
Zugriff am 11.11.2015

<http://www.quantitativeskills.com/sisa/distributions/binomial.htm>, Zugriff am 11.11.2015

8.2 Bildquellen

Abbildung 1, S. 3 basiert auf:

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 393

Abbildung 3, S. 12 stammt aus:

Gray H, Lewis WH: *Anatomy of the human body*. 20. Auflage; Lea & Febinger, Philadelphia und New York 1918, Abbildung 516, o.S.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. G. Trendelenburg für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe und seine gute Betreuung, an der ich seine ständige Erreichbarkeit und den gemeinsamen wissenschaftlichen Austausch sehr schätze.

Meinen Betreuerinnen Dr. Bozena Czech-Zechmeister und Birte Könnecke möchte ich für ihre intensive wissenschaftliche und sehr persönliche Betreuung während meines Forschungssemesters, ihren Einsatz und ihre Unterstützung bei auftretenden Problemen, auch außerhalb ihrer Arbeitszeiten, danken.

Den anderen DoktorandInnen, insbesondere Katrin Schröder und Lea Krey, danke ich für die gegenseitige Unterstützung und die schöne Gemeinschaft.