

Experimentelle Untersuchung des Neuronenverlusts bei fokaler zerebraler Ischämie im Rattenhirn nach Applikation von Gewebeplasminogenaktivator und hyperbarem Sauerstoff

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Félix Jean Jan Laignel
geboren am 21. August 1979 in Steinau an der Straße

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Härtig
(Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung)

Dr. med. Carsten Hobohm
(Klinik und Poliklinik für Neurologie, Department für Innere
Medizin, Neurologie und Dermatologie)

angefertigt am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung,
Abteilung Pathophysiologie der Neuroglia, Universität Leipzig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 24.09.2013

Bibliografische Beschreibung

Laignel, Félix Jean Jan

Experimentelle Untersuchung des Neuronenverlusts bei fokaler zerebraler Ischämie im Rattenhirn nach Applikation von Gewebefibrinolyseaktivator und hyperbarem Sauerstoff

Universität Leipzig, Dissertation

86 Seiten, 196 Literaturangaben, 18 Abbildungen, 4 Tabellen.

März 2013

Die systemische Thrombolyse mit rekombinantem Gewebefibrinolyseaktivator (rtPA) stellt das einzige pharmakologisch evidente und kausale Therapiekonzept für die Behandlung der akuten zerebralen Ischämie dar. Dieses Behandlungskonzept ist nur in einem kurzen therapeutischen Zeitfenster anwendbar und birgt das Risiko unerwünschter zum Teil lebensbedrohlicher Nebenwirkungen. Darüber hinaus ist rtPA potenziell neurotoxisch. In der vorliegenden Arbeit sollten am thrombembolischen Schlaganfallmodell der Ratte die Effekte der hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO) nach induzierter fokaler zerebraler Ischämie in Kombination mit rtPA erstmals im Langzeitverlauf von 4 Wochen untersucht werden. Grundlage hierfür waren die in früheren Studien nachgewiesenen potenziell neuroprotektiven Effekte der HBO. In 4 verschiedenen Infarkt-assoziierten Arealen wurden durch Immunperoxidase-markierung Neuronale Nuklei (NeuN) im Gehirn von Ratten detektiert und durch den Vergleich mit der kontralateralen Hemisphäre der Neuronenverlust erfasst. Mithilfe einer Dreifach-immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laserscanningmikroskopie wurden neben dem Neuronenverlust sowohl Astrogliose als auch Mikrogliaaktivierung, als wesentliche Bestandteile der neurovaskulären Einheit (NVU), qualitativ analysiert. Für die Ischämie-assoziierten Gebiete ergab sich ein über den gesamten Beobachtungszeitraum konstantes und mit dem Penumbra-Modell korrespondierendes schalenförmiges Muster des Neuronenverlusts. Die Hypothese einer Neuroprotektion durch HBO in Kombination mit rtPA konnte im Vergleich zu früheren experimentellen Studienergebnissen nicht bestätigt werden.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ABC-Komplex | Avidin-Biotin-Complex, (Strept)avidin/Biotinyl-Peroxidase-Komplex |
| AMPA | Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-isoaxozopropionsäure |
| AQP 4 | Aquaporin 4 |
| Atm | Atmosphären |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BBB | Blood-brain barrier, Blut-Hirn-Schranke |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2- Proto-Onkogen |
| BNIP3 | Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 |
| BP | Bandpassfilter |
| CA1 | Cornu ammonis des Hippokampus, Area 1 |
| CD 14 | Cluster of Differentiation 14 (Oberflächenmarker) |
| cLSM | Confocal laser-scanning microscope, konfokales Laserscanningmikroskop |
| DWI | Diffusion-weighted imaging, diffusionsgewichtete Sequenz |
| Cy2 | Carbocyanin 2 |
| Cy3 | Indocarbocyanin 3 |
| Cy5 | Indodicarbocyanin 5 |
| DAB | Diaminobenzidin |
| EPO | Erythropoeitin |
| GFAP | Glial fibrillary acidic protein, Saures Gliafaserprotein |
| HIF 1 α | Hypoxie-induzierter Faktor 1 α |
| HBO | Hyperbaric oxygen, hyperbare Sauerstofftherapie |
| Iba1 | Ionized calcium binding adaptor molecule 1 |
| ICAM-1 | Intercellular adhesion molecule 1, Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 |
| IgG | Immunglobulin der Klasse G |

| | |
|--------------|---|
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| MEZ | Medizinisch-Experimentelles Zentrum der Universität Leipzig |
| NF- κ | Nuclear factor- κ |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| NNT | Number needed to treat |
| NOS | Nitric oxide synthase, Stickstoffmonoxid-Synthase |
| NVU | neurovascular unit, Neurovaskuläre Einheit |
| NXY-0509 | 2,4-Disulfophenyl-N-tert-butylnitron |
| MCAO | Medial cerebral artery occlusion, Verschluss der Arteria cerebri media |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| p53 | Tumorprotein 53 |
| PAF | Platelet-activating factor, Plättchen-aktivierender Faktor |
| PE | Polyethylen |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PS | Phosphatidylserin |
| PWI | perfusion weighted imaging, perfusionsgewichtete Sequenz |
| ROI | Region of interest |
| ROS | Reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies |
| rtPA | Recombinant tissue plasminogen activator, rekombinanter Gewebsplasminogenaktivator |
| RSA | Rinderserumalbumin |
| RSA-TBS | Tris-gepufferte Kochsalzlösung, 2 % Rinderserumalbumin enthaltend |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Kochsalzlösung |
| TGF- β | Transforming growth factor β |

| | |
|---------------|---|
| TLR | Toll-like-Rezeptor |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor α |
| TP | Tris-Puffer |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TVV | Tierversuchsvorhaben |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor, Gefäßendothel- Wachstumsfaktor |
| VRAC | Volume-regulated anion channels, Volumen-regulierte Anionenkanäle |

SI- und SI-konforme sowie im Duden verzeichnete Einheiten sind nicht aufgeführt.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Bibliografische Beschreibung | I |
| Abkürzungsverzeichnis | II |
| Inhaltsverzeichnis | V |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Sozioökonomische Bedeutung des Schlaganfalls | 1 |
| 1.2 Pathophysiologische Grundlagen der zerebralen Ischämie | 1 |
| 1.2.1 Neuronale Zellen und Peri-Infarkt-Depolarisation..... | 2 |
| 1.2.2 Oxidativer Stress und Stickstoffmonoxid | 4 |
| 1.2.3 Nekrose und Apoptose..... | 5 |
| 1.2.4 Inflammatorische Prozesse | 5 |
| 1.2.5 Wechselwirkungen zwischen Neuronen, Astroglia und Mikroglia..... | 7 |
| 2. Therapiekonzepte bei zerebraler Ischämie | 8 |
| 2.1 Thrombolyse mit rekombinantem Gewebefibrinolyseaktivator..... | 8 |
| 2.2 Experimentelle Therapieansätze | 10 |
| 2.3 Physiologische Grundlagen der hyperbaren Sauerstofftherapie..... | 10 |
| 2.4 Nebenwirkungen der hyperbaren Sauerstofftherapie | 12 |
| 3. Zielstellung | 13 |
| 4. Material und Methoden | 14 |
| 4.1 Gewebeproben | 14 |
| 4.2 Studiendesign | 14 |
| 4.3 Material..... | 15 |
| 4.3.1 Verwendete Chemikalien | 15 |
| 4.3.2 Verwendete Lösungen | 16 |
| 4.4 Methoden..... | 17 |
| 4.4.1 Operativ induzierte thrombembolische Ischämie..... | 17 |
| 4.4.2 Applikation von rtPA und hyperbarem Sauerstoff..... | 19 |
| 4.4.3 Gewebeaufbereitung | 19 |
| 4.4.4 Auswahl der Hirnschnitte..... | 19 |
| 4.4.5 Erfassung der Infarktlokalisierung im Rattenhirn | 20 |
| 4.4.6 NeuN-Immunperoxidase Färbung | 21 |
| 4.4.7 Immunfluoreszenzmarkierung von Neuronen, Astro- und Mikroglia..... | 22 |
| 4.4.8 Kontrollfärbungen..... | 24 |

| | |
|--|------|
| 4.4.9 Mikroskopie und Bildgebung | 24 |
| 4.4.10 Semiquantitative Auswertung..... | 25 |
| 5. Ergebnisse | 27 |
| 5.1 Lokalisation der fokal zerebralen Ischämie im Rattenhirn..... | 29 |
| 5.2 Neuronenverlust in Abhängigkeit von zuvor definierten „Regions of Interests“ | 30 |
| 5.3 Interventionsabhängiger Verlauf des Neuronenverlusts | 31 |
| 5.4 Aktivierung von Astro- und Mikroglia in Abhängigkeit vom Neuronenverlust .. | 35 |
| 6. Diskussion | 41 |
| 6.1 Translationale Aspekte | 42 |
| 6.2 Die Penumbra als potenziell rettbares Hirngewebe | 45 |
| 6.3 Neuronenverlust in Abhängigkeit von zeitlichen Verlauf und Interventionskonzept..... | 47 |
| 6.4 Interaktionen von Neuronen, Astro- und Mikroglia nach fokaler zerebraler Ischämie | 51 |
| 7. Zusammenfassung | 56 |
| 8. Literaturverzeichnis | 59 |
| Tabellenverzeichnis | VII |
| Abbildungsverzeichnis | VIII |
| Lebenslauf | X |
| Publikationen | XI |
| Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit | XII |
| Danksagung | XIII |

1. Einleitung

1.1 Sozioökonomische Bedeutung des Schlaganfalls

In Deutschland erleiden schätzungsweise jährlich 196 000 Menschen erstmalig und 66 000 Menschen wiederholt einen Schlaganfall (Stand 2008; Heuschmann et al., 2010). Laut Statistischem Bundesamt (2011) führten Schlaganfälle im Jahre 2010 zu 23 675 Todesfällen in Deutschland und sind somit eine der häufigsten Todesursachen. In der westlichen Welt ist der Schlaganfall nach dem Herzinfarkt und noch vor dem Krebsleiden sogar die zweithäufigste Todesursache insgesamt (Dannon et al., 2008). Der zerebrale Insult ist zudem die häufigste Ursache erworbener Behinderungen im Erwachsenenalter. Drei Monate nach dem Ereignis weisen ca. 25% der überlebenden Patienten nach erstmaligem Hirninfarkt schwere Beeinträchtigungen im täglichen Leben auf (Ward et al., 2005).

Eine nationale Prognose für den Zeitraum 2006 bis 2025 zeigte, dass 1,5 bis 1,9 Millionen neue Schlaganfälle bei Männern und Frauen jeweils mit 51,5 bis 57,1 Milliarden EUR das Gesundheits- und Sozialsystem belasten werden (Kolominsky-Rabaset al., 2006). Derart hohe Fallzahlen verdeutlichen, dass der ischämische Schlaganfall ein weiterhin gesellschaftlich relevantes Problem mit hoher sozioökonomischer Bedeutung darstellt (Endres et al., 2008; Meairs et al., 2006). Dies erklärt die Intensivierung der Forschung, ein immer detaillierteres Verständnis der fokalen zerebralen Ischämie zu erlangen und daraus resultierend, neue Therapiekonzepte zu entwickeln.

1.2 Pathophysiologische Grundlagen der zerebralen Ischämie

Obgleich das Gehirn nur ca. 2 % des gesamten Körpergewichtes ausmacht, versorgen bis zu 14 % des Herzminutenvolumens das Gehirn (Goldman, 2012). Das Gehirn reagiert daher bereits auf kürzeste ischämische Episoden extrem empfindlich (Lee et al., 2000).

Grundlage jedes ischämischen Schlaganfalls ist die Mangelversorgung des Gehirns mit Sauerstoff. Als Hauptursachen zerebraler Ischämien gelten Thrombosen, Embolien und systemische Hypoperfusionen (Caplan, 2009). Durch die initiale Exzitotoxizität nach fokal zerebraler Ischämie werden Neurone und Gliazellen geschädigt. In der zeitlichen Folge werden dadurch eine Peri-Infarkt-Depolarisation und inflammatorische Mechanismen bis hin zur Apoptose ausgelöst. Abb. 1 illustriert den Zeitverlauf der wichtigsten schädigenden Mechanismen, die in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

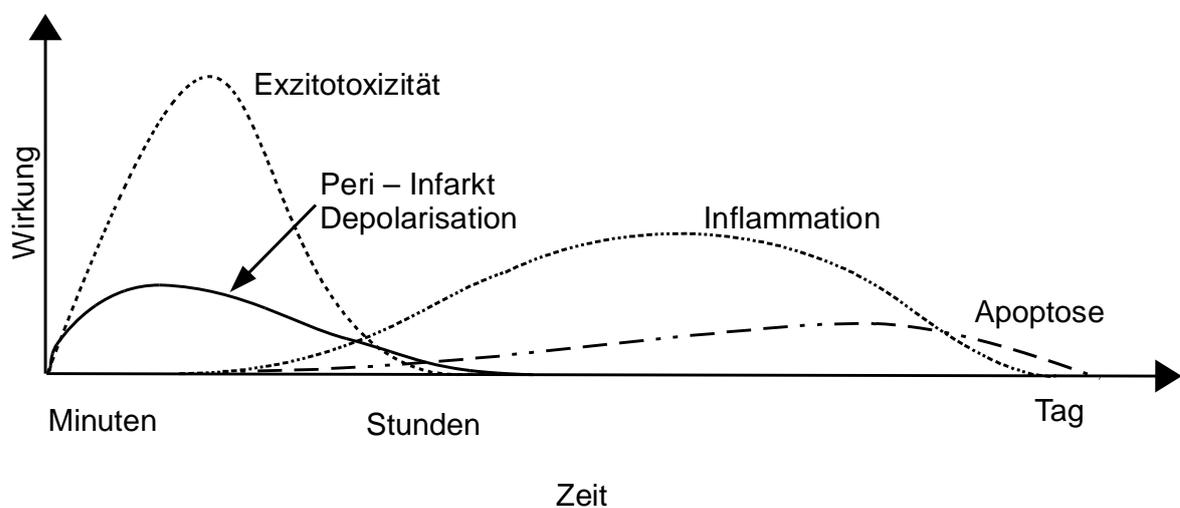


Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der ischämischen Kaskade. Durch initiale Exzitotoxizität nach fokal zerebraler Ischämie werden Neurone und Gliazellen geschädigt. Nachfolgend werden dadurch eine Peri-Infarkt-Depolarisation und inflammatorische Mechanismen bis hin zur Apoptose ausgelöst. Nach Dirnagl et al., 1999

1.2.1 Neuronale Zellen und Peri-Infarkt-Depolarisation

Die Okklusion der hirnversorgenden Gefäße und die hieraus resultierende Perfusionsstörung des Hirngewebes führen innerhalb von Sekunden zu einem Zusammenbruch der neuronalen Aktivität sowie innerhalb weniger Minuten zur Verschlechterung des energetischen Zustandes der Ionenhomöostase (Astrup et al., 1981).

Nach 6 bis 8 Sekunden ist die neuronale Energiereserve erschöpft. Adenosintriphosphat (ATP) steht nur noch unzureichend zur Verfügung (Geocadin et al., 2008). Daneben versagen membrangebundene Ionenpumpen, was den Influx von Kalzium sowie den Einstrom von Natrium- und Chloridionen sowie von Wasser in die Zellen ermöglicht. Die Elektrolytverschiebung führt schließlich zur Membrandepolarisation der Zelle (Dirnagl et al., 2009) und zum zytotoxischen Hirnödem (Simard et al., 2007).

Die beschriebenen Elektrolytverschiebungen erhöhen die Freisetzung von Glutamat aus den neuronalen Synapsen (Caplan, 2009). Nachfolgend resultiert die Aktivierung von ionotropen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) - und metabotropen α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-isoaxozopropionsäure (AMPA)-Glutamatrezeptoren, was eine weitere Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt. Darüber hinaus führt dieser Prozess der Exzitotoxizität zur Überstimulation der AMPA-Rezeptoren mit einer weiteren Erhöhung der intrazellulären Natrium- und Chloridkonzentrationen (Manev et al., 1989; Mergenthaler et al., 2004; Olney, 1969). Insbesondere die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Choi, 1995) führt zur Aktivierung von zahlreichen Enzymen wie zum Beispiel der Protease Calpain und von Proteinkinasen (Arundine und Taymanski, 2003). Die Enzyme bewirken DNA-Strangabbrüche, Veränderungen des Zytoskeletts, Membranschädigung (Trump und Berezesky et al., 1996) und eine erhöhte Produktion toxischer Stoffe wie Stickstoffmonoxid (NO), Superoxid-Anionen (O_2^-) und Wasserstoffperoxid. Schließlich können diese Enzyme auch Apoptose induzieren (Arundine und Taymanski, 2003). Des Weiteren verstärkt die intrazelluläre Kalziumakkumulation die Azidose, als ein Kennzeichen des anaeroben Stoffwechsels unter ischämischen Bedingungen (Doyle et al., 2008).

Im ischämischen Hirngewebe wird durch das gestörte Gleichgewicht zwischen elektrischen Mechanismen und Stoffwechselprozessen die Freisetzung von Kalium und Glutamat ausgelöst, und durch den Zusammenbruch der Energieversorgung eine Depolarisation ohne Möglichkeit der Repolarisation bewirkt (Somjen, 2001). In der Periinfarktregion (Neumann-Haefelin et al., 2000) erfolgt die Repolarisation nur durch hohen Energieverbrauch, und eine erneute

Depolarisation führt zu einer weiteren Konzentrationserhöhung von Kalium und Glutamat im extrazellulären Raum. Die sogenannte Peri-Infarkt-Depolarisation (Hossmann, 1996) ist laut Mies (1997) eine Ursache des Fortschreitens der ischämischen Schädigung in der Periinfarktregion.

1.2.2 Oxidativer Stress und Stickstoffmonoxid

Ausgelöst durch die zerebrale Ischämie steigt die Konzentration von freien Sauerstoffradikalen im Gehirn. Das Reaktionsprodukt von Superoxidanionen und Stickoxid, das nach Aktivierung durch die Kalzium-Calmodulin abhängigen Formen der Stickoxid-Synthase (englisch: nitric oxide synthase = NOS) generiert wird, ist das hochreaktive Peroxynitrit-Radikal. Dieser Metabolit kann nahezu mit allen zellulären und extrazellulären Komponenten reagieren und sie dadurch schädigen (Love, 1999; Mergenthaler et al., 2004).

Durch Sauerstoffradikale werden auch Matrix-Metalloproteinasen (MMP), insbesondere MMP-2 und -9 (del Zoppo et al., 2007) aktiviert. Dies führt zu einer Reduzierung von Laminin und Kollagen in der Basalmembran der Zellen, woraus eine Störung von Gefäßwänden und eine Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirn-Schranke (englisch: blood-brain barrier = BBB) resultieren (Doyle et al., 2008; Siesjö et al., 1992). MMP können ihrerseits Mikroglia durch spezifische Oberflächenrezeptoren aktivieren (del Zoppo et al., 2007). Durch freie Radikale wird auch die Signaltransduktion über Nuclear factor- κ (NF- κ) und mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) mit konsekutiver Induktion weiterer pro-inflammatorische Reaktionen ausgelöst (Denes et al., 2010).

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass auch NO eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie zerebraler Ischämien spielt (Iadecola et al., 2011). Ob NO protektive oder schädigende Effekte verursacht, ist von zeitlichen und räumlichen Umständen des ischämischen Schlaganfalls abhängig. In der frühen Phase der Ischämie können zellschädigende Prozesse reduziert werden; dagegen kann NO in der späten Phase auf mitochondriale Enzyme und den zellulären Stoffwechsel schädigend wirken (Iadecola, 1997).

1.2.3 Nekrose und Apoptose

Minuten nach einer zerebralen Ischämie kommt es zum ungeordneten Zelluntergang. In dieser frühen Phase schwellen die Zellen und ihre Organellen an, vor allem das endoplasmatische Retikulum. Dies führt zu einer Schädigung der Zytoplasmamembran sowie einer Zerstörung von Gewebe- und Organintegrität mit Auflösung der Ribosomen, Margination von Chromatin und Karyopyknose. In einer späten Phase der Nekrose kann sich das Chromatin schließlich komplett auflösen und zu einer weiteren Anschwellung der mitochondrialen Matrix führen (Bonfoco et al., 1995). Des Weiteren treten Karyorrhesis und Karyolyse auf. Durch den sukzessiven Zellzerfall und die Membranschädigung werden Zellkomponenten in den Extrazellularraum freigesetzt und lösen dort inflammatorische Prozesse aus (Snider et al., 1999; Takano et al., 1991).

Beim programmierten Zelltod, der Apoptose, bleiben Zellen und Organellen durch das noch ausreichend vorhandene energiereiche ATP lange Zeit intakt (Leist et al., 1997). Im Wesentlichen kann Apoptose auf 3 Hauptwegen ausgelöst werden: 1. durch eine vermehrte Freisetzung von Signalstoffen aus den Mitochondrien, resultierend aus einer erhöhten Membranpermeabilität (Tsujimoto et al., 1999), 2. durch die Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF α ; van Antwerp et al., 1996) und Fas-Ligand (Itoh et al., 1991) sowie 3. durch sogenannten Stress innerhalb des endoplasmatischen Retikulums (Suzuki et al., 1997), wobei sich abnorm gefaltete Proteine akkumulieren. Alle diese Mechanismen führen letztlich über eine gemeinsame Stoffwechsellkaskade durch Aktivierung von Caspase 3 zur Apoptose (Ueda et al., 2004).

1.2.4 Inflammatorische Prozesse

Wie bereits unter 1.2 erwähnt, spielen bei der Pathogenese der zerebralen Ischämie auch inflammatorische Prozesse eine wesentliche Rolle (Becker, 1998; Huang et al., 2006). Zu Beginn steigt die Zahl der Leukozyten im ischämischen Areal deutlich an (Emsley et al., 2003), und die Anzahl neutrophiler Granulozyten

ist erhöht (Linsberg et al., 1996), wobei ihre Zahl mit der Infarktgröße korreliert (Buck et al., 2008). Daneben scheinen auch zirkulierende Monozyten (Kochnek et al., 1992) und dendritische Zellen (Yilmaz et al., 2009) in der postischämischen Phase erhöht zu sein.

Innerhalb des inflammatorischen Gewebes nehmen die Mikroglia, als Makrophagen des zentralen Nervensystems, eine besondere Stellung ein (Kreuzberg et al., 1996). Die durch CD14- und Toll Like-Rezeptoren (TLR) aktivierte Mikroglia (Saito et al., 2000) trägt durch Phagozytose und Freisetzung von NO und TNF α zur Aktivierung weiterer Signalkaskaden bei, was zum Untergang von Neuronen sowie anderen Zellen im Gehirn führt (Kim et al., 2005).

In der Phase des prothrombotischen Zustandes erfolgt eine weitere Aktivierung von Monozyten, Makrophagen, Blutplättchen, Endothelzellen und T-Lymphozyten. Das Ungleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen Molekülen erhöht die Produktion von Zytokinen, von Interleukinen-1 β , -4, -6 und -10 sowie TNF α , und steigert so die Produktion von Adhäsionsmolekülen wie E- und L-Selektin und intrazellulärem Adhäsionsmolekül (englisch: Intercellular adhesion molecule 1 = ICAM-1; Wang et al., 2007).

MMP scheinen in der Folge auch hochreguliert zu werden (Wang et al., 2007). Dabei korreliert die Expression von MMP-9 mit der Schwere des Krankheitsverlaufs (Rosell et al., 2006).

Der Hypoxie-induzierte Faktor-1 α (HIF-1 α) regelt unter physiologischen Bedingungen die Homöostase des Sauerstoffs und sorgt für die Adaptation an zellulär-hypoxische Bedingungen (Chen et al., 2008). Des Weiteren spielt HIF-1 α eine wichtige Rolle bei der Angiogenese (Pugh und Ratcliffe, 2003) und Erythropoese (Ratcliffe, 2002). Zudem ist HIF-1 α an der Regulierung des neuronalen Zelltods beteiligt (Helton et al., 2005). Beim Verlust von HIF-1 α in Astrozyten fällt die Schutzfunktion der Neuronen vor ischämischen Schäden weg (Vangeison et al., 2008). HIF-1 α scheint somit sowohl den inflammatorischen als auch den ischämisch vermittelten Zelltod durch die Expression von p53 (englisch:

tumor protein 53; Halterman und Federoff, 1999) und Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 (BNIP3, Mellor und Adrian, 2007) zu verantworten.

1.2.5 Wechselwirkungen zwischen Neuronen, Astroglia und Mikroglia

Bei der Untersuchung der zerebralen Ischämie standen bei früheren Studien in der Regel die Neurone im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Neuere Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass diese eingeengte Perspektive zum Verständnis der komplexen Prozesse im zentralen Nervensystem nicht ausreichend ist (Lok et al., 2007). Im Fokus stehen heute die Neurone und deren Wechselwirkungen mit Astro- und Mikroglia, Gefäßen bzw. deren Interaktionen mit der BBB. Die Summe all dieser Komponenten wird durch den Begriff der Neurovaskulären Einheit (NVU) beschrieben (del Zoppo et al., 2010). Das Wechselspiel zwischen Neuronen, Astrozyten und Gefäßendothel ist an zahlreichen Hirnfunktionen beteiligt (Abb. 2). Durch Neurotransmitter werden aus den Astrozyten vasoaktive Moleküle freigesetzt, die an das Endothel der zerebralen Arteriolen binden und damit an der Steuerung des Gefäßtonus im Gehirn mitbeteiligt sind. Es hat sich gezeigt, dass durch neuronale Stimulation die intrazelluläre Kalziumkonzentration in den Astrozyten ansteigt und damit eine verstärkte Freisetzung von neuroaktiven Molekülen, Neurotransmittern und vasoaktiven Substanzen auslöst (Fellin und Carmignoto, 2004).

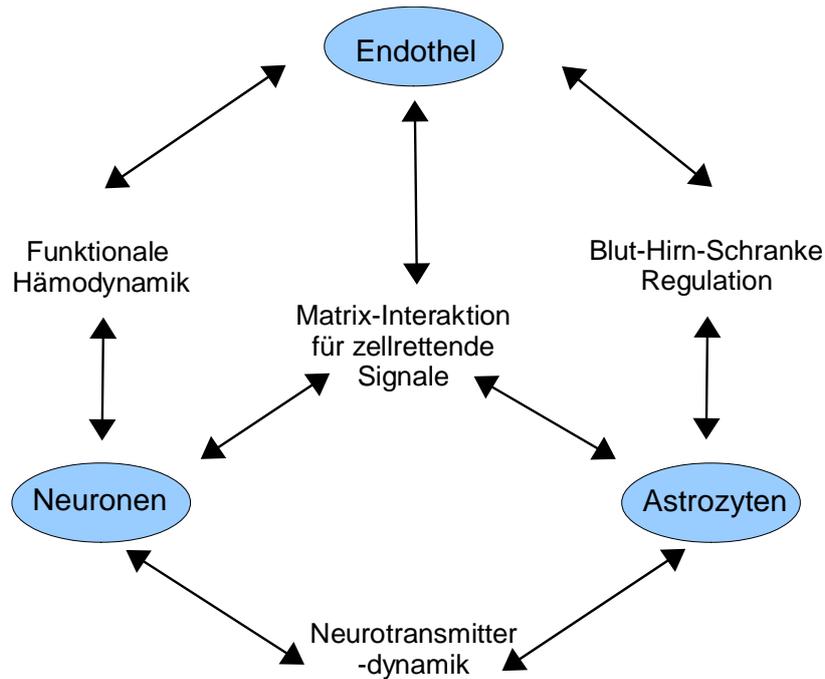


Abbildung 2: Schematische Darstellung der NVU mit Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktion. Nach Lo et al., 2004 und Lok et al., 2007

Die im Rahmen der zerebralen Ischämie aktivierte Mikroglia setzen lösliche Mediatoren frei, die Neurone zur Expression von Phosphatidylserin (PS) veranlassen und so die Phagozytose anregen (Neher et al., 2011).

2. Therapiekonzepte bei zerebraler Ischämie

2.1 Thrombolyse mit rekombinantem Gewebefibrinolyseaktivator

Nach wie vor stellt die intravenöse Thrombolyse mit rekombinantem Gewebefibrinolyseaktivator (rtPA) die wichtigste pharmakologische Behandlungsoption bei akuter zerebraler Ischämie dar (Sutherland et al., 2012). Bei rtPA handelt es sich um eine Serin-Protease, die über die Aktivierung von Plasmin ihre fibrinolytische Wirkung entfaltet und zur Lyse von Thromben führt (Irigoyen et al., 1999; Nesheim et al., 2001), sodass durch Wiederherstellung des Blutflusses von einer Ischämie bedrohtes Hirngewebe gerettet werden kann (Kaur et al., 2004).

Mehrere multizentrische, randomisierte und Placebo-kontrollierte Studien untersuchten den Nutzen von rtPA nach akuter zerebraler Ischämie in einem Zeitraum von 0 bis 6 Stunden nach Symptombeginn. Dabei ergab sich eine signifikante Verbesserung des klinischen Outcomes im Vergleich zu einer Placebo-Therapie (Clark et al., 1999; Clark et al., 2000; Hacke et al., 1995,1998; The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Für die ersten 3 Stunden nach einem ischämischen Schlaganfall zeigte sich ein besonders positiver Effekt der intravenösen rtPA Therapie auf das klinisch-funktionelle Outcome. Mit einer number needed to treat (NNT) von 7 für das Therapiefenster 0 - 3 Stunden nach Symptombeginn gegenüber einem NNT von 24 für das Therapiefenster 3 - 6 Stunden (Hacke et al., 1999). Die Ergebnisse der weiterführenden ECASS III-Studie (englisch: The European Cooperative Acute Stroke Study) zeigten, dass auch Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall von einer Erweiterung des Therapiefensters auf 4,5 Stunden klinisch profitieren. Zwar erhöhte sich dabei die Rate symptomatischer intrakranieller Blutungen, ohne dass dies zu einer signifikanten Erhöhung der Mortalitätsrate führte (Hacke et al., 2008; Bluhmki et al., 2009).

Dessen ungeachtet kann aufgrund des kurzen Therapiefensters insgesamt nur bei einer geringen Zahl von Patienten die Thrombolysebehandlung durchgeführt werden. 2008 erhielten nur ca. 7 -10% der Patienten eine Lysetherapie (Heuschmann et al. 2010).

Es zeigt sich zudem, dass die Behandlung mit rtPA nicht ohne Risiken bleibt. So ist dieses Therapiekonzept mit einem erhöhten intrazerebralen Blutungsrisiko verbunden (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Neben der hämorrhagischen Transformation wurden im klinischen Einsatz noch andere neurotoxische Nebenwirkungen deutlich (Armstead et al., 2010). rtPA bewirkt durch die Aktivierung von MMP-9 die Schädigung der BBB-Integrität. Die Aktivierung der MMP-9 erfolgt durch vasoaktive Stoffe und die Spaltung von NMDA sowie weiterer Signalwege (Rosell et al., 2006; Kaur et al., 2004).

2.2 Experimentelle Therapieansätze

In den vergangenen Jahren hat sich die Hypothermie als ein vielversprechendes Mittel zur Eindämmung primärer und sekundärer Hirnschädigungen erwiesen. Auch wenn deren detaillierte Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind, so beeinflusst die Hypothermie vermutlich Apoptose und Inflammation, die Produktion von freien Radikalen sowie den Stoffwechsel und die BBB-Integrität in positiver Weise (Yenari et al. 2012).

Zusätzlich wurde versucht, das verbesserte Verständnis der fokalen zerebralen Ischämie und ihrer Pathophysiologie für die Entwicklung neuer neuroprotektiver Substanzen zu nutzen. Diskutiert werden hierbei zum Beispiel NMDA- und Glutamatrezeptoren, Kalzium- und Natriumkanäle, Sauerstoffradikale sowie Albumin, Statine und Magnesium (Minnerup et al., 2012; Tuttolomondo et al., 2009). Trotz vielversprechender präklinischer Ergebnisse gelang in keinem Fall die Translation in eine klinische Anwendung (Deb et al., 2010; Tuttolomondo et al., 2009; Wahlgren und Ahmed, 2004).

Dem geschuldet wurde eine Diskussion über die verwendeten tierexperimentellen Modelle und Studienabläufe, wie die Observationsdauer, ausgelöst. Tierexperimentelle Modelle sollen in Zukunft so nah wie möglich an die Prozesse im menschlichen Organismus angeglichen werden, wobei besonders die postinterventionelle Phase zu berücksichtigen ist (Candelario-Jalil, 2009; Endres et al., 2008; Li und Tatlisumak, 2006; Meairs et al., 2006; Young et al., 2007).

Wichtig für die Zukunft erscheint die Entwicklung multimodaler Therapiekonzepte. In diesem Kontext bietet die hyperbare Sauerstofftherapie (HBO) vielversprechende Ansätze.

2.3 Physiologische Grundlagen der hyperbaren Sauerstofftherapie

Die positiven Effekte der hyperbaren Oxygenierung können partiell durch physikalische Gesetze und deren Beziehungen zu Gas-Volumina, Druck und Konzentration erklärt werden. Bei der HBO wird 100 %iger Sauerstoff bei einem

erhöhten Umgebungsdruck inhalativ appliziert. Dieser Druck liegt mit zumeist 2 - 3 Atmosphären (atm) 2- bis 3-mal über dem des mittleren Umgebungsdrucks von 1 atm auf Meereshöhe (=100 kPa oder 760 torr bzw. 760 mmHg sowie 1 bar; Tibbles und Edelsberg, 1996).

Die chemische Bindung an Hämoglobin macht den Großteil des Sauerstofftransports im Blut aus. Das Hämoglobin (Hb) ist nach der Lungenpassage unter normobaren Bedingungen bereits zu 97 % mit Sauerstoff gesättigt (Berrouschot et al., 1998). Ein Gramm Hämoglobin (Hb) kann unter physiologischen Bedingungen ca. 1,34 ml O₂ binden. Dies wird als sogenannte Hüfner-Zahl bezeichnet (Villota et al., 1981). Bei einem Hb-Gehalt von ca. 15 g/dl können somit 200 ml O₂/l Blut gebunden werden. Unter normobarem Umgebungsdruck (1atm) liegt der Sauerstoffgehalt der Erdatmosphäre bei 21 %. Durch eine Steigerung der Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft auf 100 % lässt sich die Sauerstoffkonzentration maximal auf einen Wert von 15 ml O₂/l Blut erhöhen (Leach et al., 1998).

Der physikalisch gelöste Sauerstoffanteil ist relativ gering. Die gelöste Sauerstoffkonzentration im Plasma beträgt im Blut nur etwa 3 ml O₂/l bei einem arteriellem Sauerstoffpartialdruck (paO₂) von 55 mmHg (Gill und Bell, 2004; Sheffield, 1985), was einen Anteil von ca. 1,5 % des im Blut befindlichen Sauerstoffs ausmacht. Dieser Zusammenhang wird durch das Gesetz von Dalton beschrieben, nach dem sich der Gesamtdruck eines Gases aus den Partialdrücken der einzelnen Gasanteile ergibt (Dalton, 1805). Der gelöste Sauerstoffgehalt im Blut ist jedoch direkt proportional zum angelegten Umgebungsdruck (Henry, 1803) und könnte somit theoretisch beliebig gesteigert werden. So erhöht sich zum Beispiel bei einer Steigerung des Umgebungsdrucks auf 3 bar der gelöste Sauerstoff auf 65 ml/l Blut bzw. 2000 mmHg (Lambertsen et al., 1953, Übersicht: Michalski et al., 2011) mit einem Gewebesauerstoffpartialdruck von 200 bis 400 mmHg. Durch den erhöhten Sauerstoffgehalt im arteriellen Blut verlängert sich gemäß dem Fick'schen Gesetz (Fick, 1855), die Diffusion von Gasen und verbessert somit die Sauerstoffversorgung des Gewebes (Leach et al., 1998; Gill und Bell, 2004).

2.4 Nebenwirkungen der hyperbaren Sauerstofftherapie

Die inhalative Applikation von hyperbarem Sauerstoff birgt auch gewisse Risiken und Nebenwirkungen. So lässt sich eine toxische Wirkung von Sauerstoff im zentralen Nervensystem bei hohem paO_2 mit langen Expositionszeiten nachweisen (Hampson et al., 2003). Außerdem zeigte sich, dass die Entstehung freier Radikale im Gehirn durch die Applikation von hyperbarem Sauerstoff auch von unter 4 atm (Matchett et al., 2009) verstärkt wird (Chavko, 1996; Ito et al., 1996). Diese freien Radikale bedingen durch Lipidperoxidation die Zerstörung von Membranen sowie die Oxidation von Zellproteinen (Chavko, 1996). Allerdings sind die freien Radikale nur unter hyperbaren Bedingungen erhöht, sodass nach Beendigung der HBO keine erhöhte Lipidperoxidation mehr nachweisbar ist (Noda et al., 1983). Zu den häufigsten Nebenwirkungen der HBO werden Barotraumata des Mittel- und des Innenohrs oder der Zähne gezählt (Plafki et al., 2000). Die wesentlichen Nebenwirkungen im zentralen Nervensystem sind durch Sauerstoff ausgelöste Krampfanfälle (Seckin et al., 2011; Tibbles et al., 1996).

3. Zielstellung

Die fokale zerebrale Ischämie führt durch eine verminderte Blutversorgung zu nutritiver Deprivation des Hirngewebes, über direkte und indirekte Mechanismen zu dessen Schädigung und konsekutiv zu einem irreversiblen Neuronenverlust. In der akuten Schlaganfalltherapie hat sich die Applikation von rtPA als einziges evidentes, kausales Therapiekonzept etabliert. Alle Bemühungen, experimentell Erfolg versprechende Neuroprotektiva in die klinische Anwendung zu translätieren, sind bisher gescheitert (O'Collins et al., 2006). Es bedarf weiterer Anstrengungen der translationalen Medizin zur Evaluierung neuer Therapiekonzepte.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Validierung neuroprotektiver Effekte einer hyperbaren Sauerstofftherapie bei simultaner systemischer Thrombolyse mit rtPA im thrombembolischen Schlaganfallmodell der Ratte. Zugrunde lag die Annahme, dass durch die Kombinationstherapie von rtPA mit HBO zum einen die neurotoxischen Nebenwirkungen von rtPA abgeschwächt und zum anderen durch das neuroprotektive Potenzial der HBO die Neuronenverluste reduziert werden. Zur Bestätigung dieser Annahme sollte in einer semiquantitativen Analyse der Neuronenverlust untersucht werden. Für die Detektion der Neurone war die Immunperoxidase-Färbung von NeuN vorgesehen. Für die Bestimmung des Neuronenverlusts diente der Vergleich zwischen läsionierter und gesunder kontralateraler Hemisphäre in 2 Versuchsgruppen (rtPA-Versuchsgruppe und rtPA/HBO-Versuchsgruppe) sowie einer Kontrollgruppe. Zur Evaluierung der Zeitabhängigkeit des Neuronenverlusts nach induzierter fokal zerebraler Ischämie erfolgte die Einteilung der Versuchsgruppen in Beobachtungszeiträume von 24 Stunden, 7, 14 sowie 28 Tage. Um räumliche Beziehungen der glialen Reaktionen zum Neuronenverlust qualitativ zu analysieren und somit die Veränderung der neurovaskulären Einheit nach Ischämie zu erfassen, wurde zudem eine simultane Fluoreszenzmarkierung von Neuronen, Astro- und Mikroglia durchgeführt.

4. Material und Methoden

4.1 Gewebeproben

Für die durchgeführten Tierversuche wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von ca. 300g verwendet. Die Tiere wurden durch das Medizinisch-Experimentelle Zentrum (MEZ) der Medizinischen Fakultät Leipzig und Charles River (Sulzfeld; Deutschland) bereitgestellt und nach den Direktiven des European Communities Council (86/609/ECC) behandelt. Die Tierversuche wurden im Rahmen des vom Regierungspräsidium Leipzig genehmigten Tierversuchsvorhabens TVV 23/06 von Dr. Lea Küppers-Tiedt und Dr. Dominik Michalski im MEZ durchgeführt.

4.2 Studiendesign

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Grundlage einer experimentellen Tierversuchsstudie am Rattenmodell. Die untersuchten Gehirne waren Gegenstand einer im Jahr 2009 publizierten Studie von Michalski et al., aus dem Material von 36 Tieren für histologische Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Dissertation zur Verfügung gestellt wurde. Bei allen Versuchstieren wurde durch einen operativ induzierten thrombembolischen Verschluss der rechten Arteria cerebri media ein ischämischer Schlaganfall ausgelöst. Danach erfolgte eine konsekutive Zuordnung der Tiere auf 3 Versuchsgruppen: Kontrolle, Lysetherapie (= rtPA-Gruppe) und Lysetherapie in Kombination mit hyperbarem Sauerstoff (= rtPA/HBO-Gruppe). Für jede Versuchsgruppe wurden zusätzlich jeweils 3 Tiere pro Beobachtungszeitraum ausgewählt. Der Beobachtungszeitraum belief sich auf 24 Stunden, 7, 14 und 28 Tage (Abb. 3).

Operativ induzierte thrombembolische Ischämie

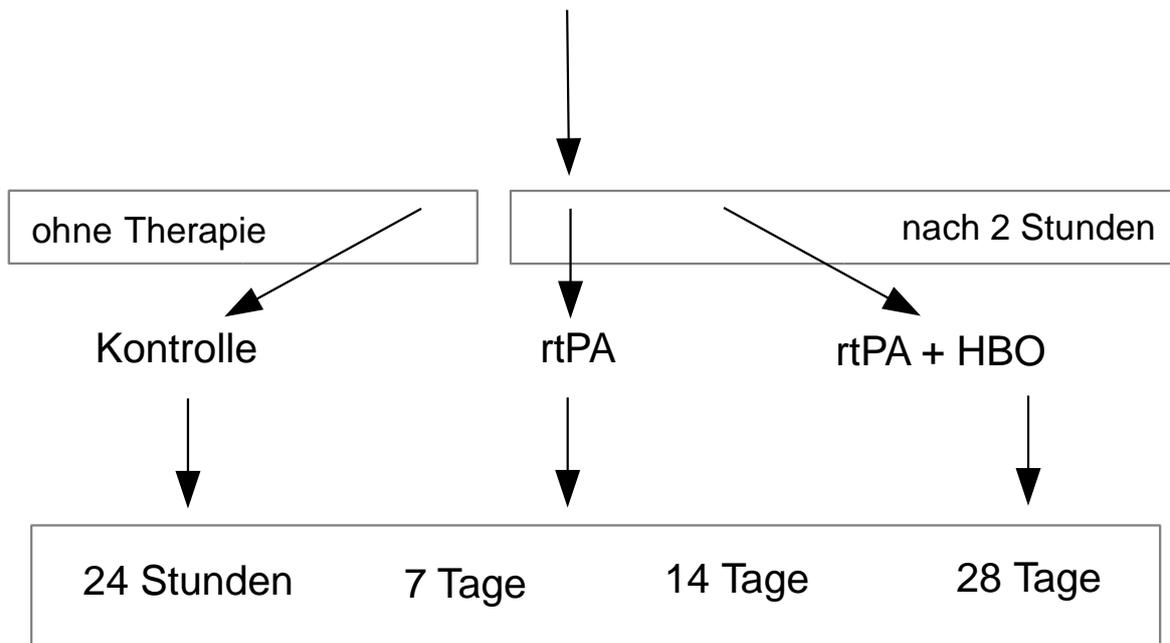


Abbildung 3: Schematische Übersicht über die Versuchsgruppen. Nach experimentell induzierter fokaler zerebraler Ischämie erfolgte eine konsekutive Zuordnung auf die Versuchsgruppen mit rtPA, rtPA/HBO sowie auf die Kontrollgruppe mit 3 Tieren je Beobachtungszeitraum von 24 Stunden, 7, 14 und 28 Tagen.

4.3 Material

4.3.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

| Substanz | Firma |
|------------------|---------------------------|
| Eiweißglyzerin | Hollborn & Söhne, Leipzig |
| Entellan | Merck, Darmstadt |
| Esel-Normalserum | Dianova, Hamburg |
| Natriumazid | Merck, Darmstadt |

| | |
|---|--|
| Natriumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Biotinylierte Meerrettichperoxidase | Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; modifiziert mit Biotinylamidocaproyl-N-hydroxysuccinimidester, Sigma (Härtig et al., 1995) |
| Biotinyliertes Ziegen-anti-Maus IgG (hochgereinigt, ohne Kreuzreaktivität mit Ratten IgG) | Dianova, Hamburg |
| Paraformaldehyd | Merck, Darmstadt |
| Rinderserumalbumin | Serva, Heidelberg |
| Saccharose | Carl Roth, Karlsruhe |
| Streptavidin | Invitrogen, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Ferak, Berlin |
| Toluol | Merck, Darmstadt |
| Wasserstoffperoxid (30%ig, Perhydrol) | Merck, Darmstadt |
| Ziege-Normalserum | Dianova, Hamburg |

4.3.2 Verwendete Lösungen

Tabelle 2: Verwendete Lösungen

| Lösung | Substanz | Firma |
|---|---|----------------------|
| Tris-gepufferte Kochsalzlösung, 0,1 M, pH 7,4 (TBS) | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Natriumchlorid, 0,85 % [w/v] mit Salzsäure (HCl, 37 %ig) | Carl Roth, Karlsruhe |

| | | |
|----------------------------------|--|--|
| | pH 7,4 eingestellt | |
| Tris-Puffer, 0,05 M, pH 8,0 (TP) | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) mit Salzsäure (HCl, 37 %ig) pH 8,0 eingestellt | Carl Roth, Karlsruhe |
| Diaminobenzidin-Lösung | 0,05 M Tris-Puffer, pH 7,6; pro ml 2 mg Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Nickel-DAB-Lösung | 0,05 M Tris- Puffer, pH 8,0; pro 10 ml 2 mg Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid 40 mg Nickelammoniumsulfat-Hexahydrat | Sigma-Aldrich, Taufkirchen Riedel-de-Haën, Seelze |

4.4 Methoden

4.4.1 Operativ induzierte thrombembolische Ischämie

Grundlage für die Erzeugung der rechtsseitigen fokalen zerebralen Ischämie war das thrombembolische „Middle cerebral artery occlusion“ (MCAO) -Modell von Zhang et al. (1997) in der Modifikation nach Küppers-Tiedt (2008) und Michalski et al. (2009). Hierbei wurde ein dünner Polyethylen-Katheter mit konischem Ende über eine Inzision der Arteria carotis externa - über die Bifurkation - in die Arteria carotis interna bis zum Ursprung der Arteria cerebri media dextra vorgeschoben. In dieser Position erfolgte die Injektion eines gewichtsadaptierten Blutgerinnsels, eines sogenannten „Clots“. Anschließend wurde der Katheter zurückgezogen und letztlich entfernt.

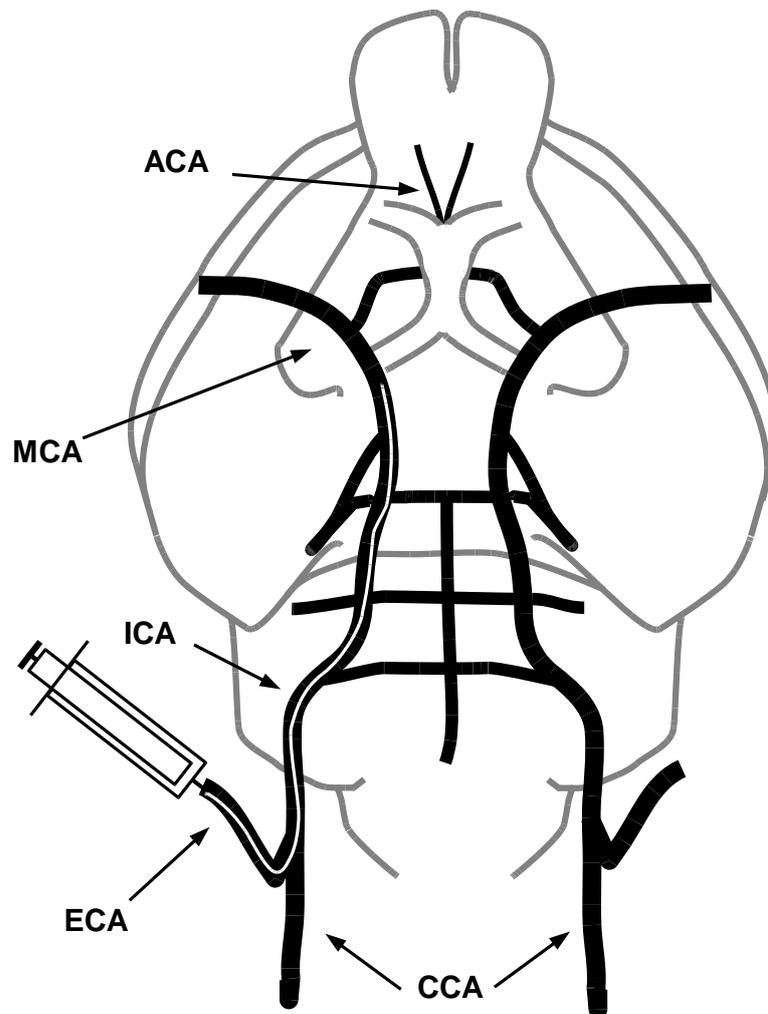


Abbildung 4: Schematische Übersicht des Eingriffs. ACA = Arteria cerebri anterior, MCA = Arteria cerebri media, ICA = Arteria carotis interna, ECA = Arteria carotis externa, CCA = Arteria carotis communis. Nach Zhang et al. (1997).

Für die perioperative Anästhesie wurden die Tiere mit Isofluran (um 2,5 %) in einer Mischung mit 70 % N₂O und 30 % O₂ behandelt (Baughman et al., 1988). Während des Eingriffs wurde die Körpertemperatur der Tiere auf etwa 37 °C gehalten, wozu ein Wärmepad mit rektaler Temperatursonde der Firma Fine Science Tools (Heidelberg) diente und hierdurch eine narkosebedingte Auskühlung vermieden werden konnte.

4.4.2 Applikation von rtPA und hyperbarem Sauerstoff

Nach Durchführung der MCAO wurden die Tiere je nach Versuchsgruppe mit rtPA und hyperbarem Sauerstoff behandelt.

Dabei erhielt die rtPA-Versuchsgruppe 2 Stunden nach der MCAO einen rekombinanten gewebsspezifischen Plasminogenaktivator (Actilyse, Boehringer Ingelheim, Ingelheim) in einer Dosierung von 9 mg/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 30 Minuten mit einem Gesamtvolumen von 1 ml.

Die rtPA/HBO-Versuchsgruppe erhielt zusätzlich 2 Stunden nach der MCAO mithilfe einer für das Tiermodell konfigurierten Überdruckkammer (Sayers/Hebold, Cuxhaven) einmalig über 1 Stunde 100 % Sauerstoff bei einem Umgebungsdruck von 2,4 atm (Michalski et al., 2009). Die Kontrollgruppe erhielt nach Thrombusinjektion weder rtPA noch HBO.

4.4.3 Gewebeaufbereitung

Für die anzufertigenden Gefrierschnitte wurden die mit phosphatgepuffertem 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixierten und anschließend in 30 %iger phosphatgepuffertes Saccharoselösung äquilibrierten Hirne auf -40 °C gekühlt, auf dem Objekthalter des Gefrierschnitt-Mikrotoms (Leica) befestigt und bei -20 °C von rostral nach kaudal in 30 µm dicke Koronalschnitte geschnitten. Die erhaltenen Schnitte wurden in 0,1 M Tris-gepuffertes Kochsalzlösung mit pH 7,4 (Tris-buffered saline = TBS) mit Zusatz von 0,05 % Natriumazid bei 4 °C gelagert.

4.4.4 Auswahl der Hirnschnitte

Von den gewonnenen Hirnschnitten wurden für die Immunperoxidase-Färbung jeweils 8 Schnitte pro Versuchstier ausgewählt. Die Auswahl erfolgte anhand der anatomischen Strukturen mithilfe eines stereotaktischen Atlas des Rattenhirns (Paxinos und Watson, 1998).

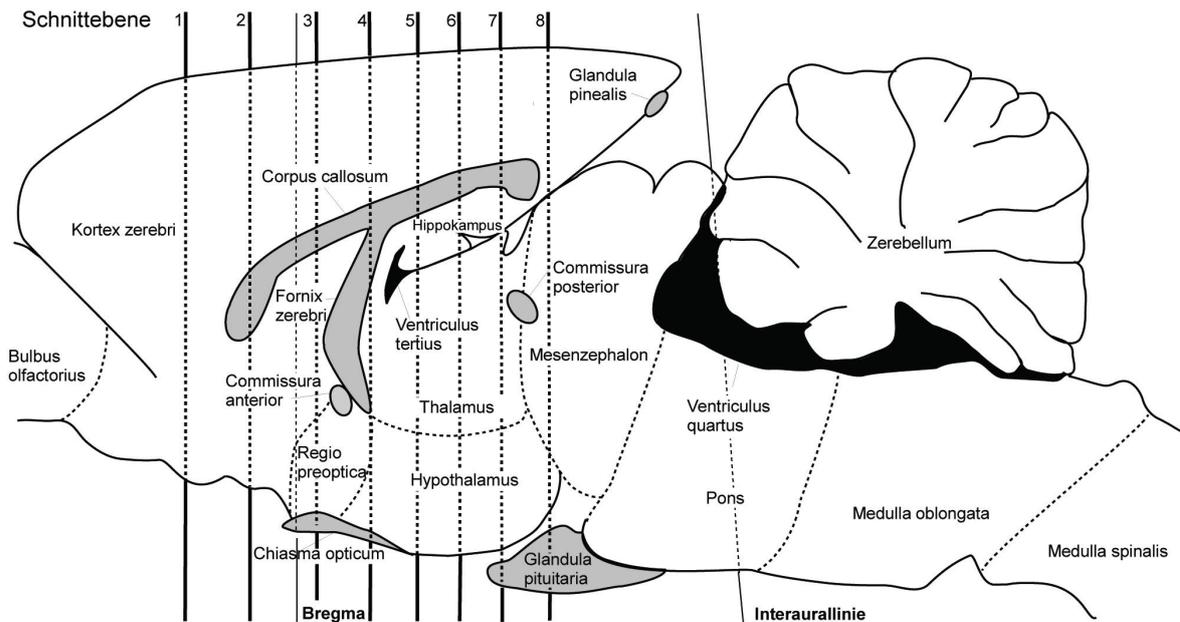


Abbildung 5: Schematische Übersicht über die gewählten Schnittebenen. Sagittaler Rattenhirnschnitt der lateralen Mediaebene, der die ausgewählten Frontalschnittebenen zeigt. Modifiziert nach Paxinos und Watson (1998).

4.4.5 Erfassung der Infarktlokalisierung im Rattenhirn

Die Detektion der Infarktregionen und deren Ausdehnung in den 36 Versuchstieren der 3 untersuchten Versuchsgruppen erfolgte durch qualitative Auswertung auf Grundlage einer CD68 Immunperoxidasefärbung sowie einer Markierung von Saurem Gliafaserprotein (GFAP = englisch: glial fibrillary acidic protein). Anhand der Doppelmarkierung erfolgte eine Beurteilung der Infarktlokalisierung durch die frühe Aktivierung von Astrozyten mittels GFAP 24 Stunden nach Infarkt. Durch die Detektion von aktivierter Mikroglia mittels CD68 konnten die Infarktlokalisierungen in den späteren Beobachtungszeiträumen von 7 bis 28 Tage erfasst werden. Zur besseren Übersicht wurde das Rattenhirn nach dem stereotaktischen Atlas des Rattenhirns (Paxinos und Watson, 1998) in 6 Hirnregionen unterteilt: Neokortex, Hippokampus, Thalamus, Basalganglien, Amygdala und Hypothalamus (Abb. 6). Die Analyse erfolgte mithilfe eines Stereomikroskops (Stemi DV4, Zeiss) durch zwei unabhängige Auswerter.

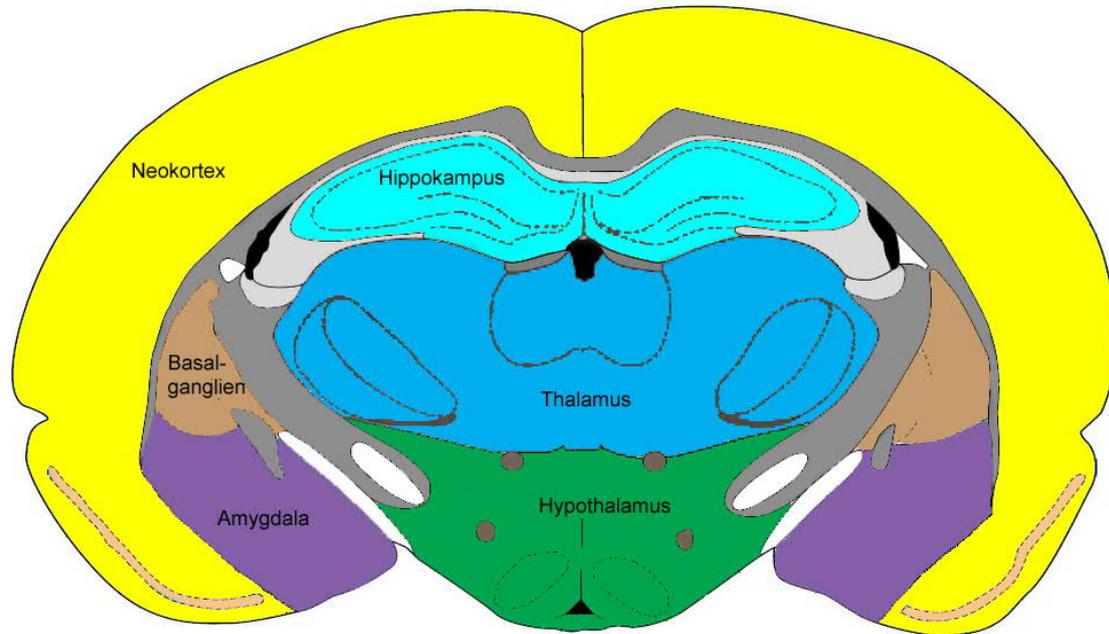


Abbildung 6: Übersicht über die untersuchten Hirnregionen. Farbige Unterteilung der untersuchten Hirnregion im koronalen schematischen Übersichtsschnitt: Neokortex = gelb, Hippokampus = türkis, Thalamus = blau, Hypothalamus = grün, Basalganglien = braun, Amygdala = lila. Modifiziert nach Paxinos und Watson (1998)

4.4.6 NeuN-Immunperoxidase Färbung

Von insgesamt 36 Gehirnen wurden für die Färbungen mit NeuN-Markierung, als pan-neuronalem Marker, (Mullen et al., 1992) 8 Schnitte aus dem Infarktgebiet und der kontralateralen Seite ausgewählt. Die Immunperoxidasefärbung erfolgte mit einer Streptavidin/Biotin-Technik und Nickel verstärktem Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen nach Härtig et al. (1995).

Alle Schnitte wurden in einem ersten Schritt mit TBS gewaschen. Daraufhin wurde die Peroxidaseaktivität mit 0,6 %igem Wasserstoffperoxid mit TBS für 30 Minuten geblockt. Nach 3-maligem Waschen mit TBS über je 10 Minuten wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen mit 5 %igen Ziege-Normalserum mit 0,3% Triton X-100 in TBS für eine Stunde geblockt.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit monoklonalem Maus-Antikörper gegen Neuronale Nuclei (NeuN; Millipore, Billerica, MA, USA; MAB377, Klon A60, Verdünnung 1:200 in der Blockierlösung) für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach 3-maligem Waschen mit TBS für je 10 Minuten erfolgte für 1 Stunde die Inkubation mit hoch gereinigtem biotinyliertem Ziege-Anti-Maus IgG (1:500 in 2 %igem Rinderserumalbumin in TBS = RSA-TBS).

Nach erneutem 3-maligem Waschen mit TBS für je 10 Minuten wurde das Gewebe für 1 Stunde in präformierten ABC-Komplexen (Avidin-Biotin-Complexes) aus Streptavidin (12,5 µg/µl RSA-TBS) und biotinylierter HRP (5 µg/ml) inkubiert.

Das Gewebe wurde daraufhin 2-mal für je 10 Minuten in TBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte für ca. 5 bis 10 Minuten mit Nickel-DAB-Lösung (2 mg Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid und 40 mg Nickelammoniumsulfat-Hexahydrat in 10 ml 0,05 M Tris-Puffer, pH 8,0) inkubiert.

Die anschließende Visualisierungsreaktion mit einem blau-schwarzen Präzipitat erfolgte mit 0,5 µl 30% Wasserstoffperoxid pro ml Nickel-DAB-Lösung.

Das Gewebe wurde wiederum 3-mal für je 10 Minuten mit TBS gewaschen, etwa 1 Minute mit destilliertem Wasser gespült, auf Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Schnitte mit Entellan in Toluol (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

4.4.7 Immunfluoreszenzmarkierung von Neuronen, Astro- und Mikroglia

Zur Visualisierung der Lagebeziehungen und Darstellung der beteiligten neuronalen Zellpopulationen nach dem Konzept der NVU (del Zoppo et al., 2009; Fellin und Carmignoto 2004) erfolgte begleitend zur NeuN-Färbung eine Dreifachmarkierung von Neuronen durch deren Marker NeuN, von Astrozyten mittels GFAP bzw. von Mikroglia durch das kalziumbindende Protein Iba1 (englisch: ionized calcium binding adaptor molecule 1). Eine Übersicht über die bei

der vorliegenden Arbeit verwendeten Mehrfachfluoreszenzmarkierungen gibt die nachfolgende Tab. 3.

Tabelle 3: Dreifachimmunfluoreszenzmarkierung

| Primärantikörper | Hersteller | Verdünnung | Sekundärantikörper* |
|-------------------------------|--------------------------------|------------|--|
| Maus-anti-NeuN | Invitrogen, Karlsruhe | 1:50 | Cy2-Esel-anti-Maus IgG |
| Meerschweinchen- anti-GFAP | Synaptic Systems, Göttingen | 1:400 | Cy3-Esel-anti-Meer- schweinchen IgG |
| Kaninchen-anti- Iba1 | Wako, Neuss | 1:200 | Cy5-Esel-anti- Kaninchen IgG |

* Alle fluorochromierten Sekundärantikörper von Dianova, Hamburg

Hierzu wurden die Schnitte zunächst 3-mal zu je 10 Minuten in TBS gewaschen. Daraufhin wurden die unspezifischen Bindungsstellen für die nachfolgend applizierten Antikörper für eine Stunde mit 5 % Eselnormalserum in TBS, 0,3 % Triton X-100 enthaltend (ENS-TBS-T), geblockt. Anschließend erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur die Inkubation mit einem Reaktionsgemisch aus Maus-anti-NeuN, Meerschweinchen-anti-GFAP und Kaninchen-anti-Iba 1.

Danach folgte ein 3-maliges Waschen mit TBS. Das Gewebe wurde daraufhin für 1 Stunde mit einem Cocktail aus Carbocyanin 2 (Cy2)-anti-Maus, Cy3-anti-Meerschweinchen und Cy5-anti-Kaninchen (alle 20 µg/ml) in RSA-TBS inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte erneut gründlich mit TBS gewaschen, kurz mit destilliertem Wasser gespült, auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und mit Entellan eingedeckt.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Objektträger erfolgte am Axioplan (Zeiss) und einem konfokalen Laserscanningmikroskop (cLSM) 510 Meta (Zeiss). Das LSM war mit einem Argon-Laser zur Anregung von Cy2 sowie 2-Helium Neon-Lasern zur Anregung von Cy3 sowie Cy5 ausgestattet (Tab.: 4). Mit

Bandpassfiltern (BP) von 500-530 nm wurde das Durchscheinen anderer Marker verhindert. Die mit einem BP von 654 – 718 detektierte infrarote Cy5 Fluoreszenz wurde blau kodiert.

Tabelle 4: Technische Daten zur Laserscanning-Mikroskopie

| Lasertyp | Wellenlänge λ in nm | detektiertes Fluorophor |
|---------------|-----------------------------|-------------------------|
| Helium-Neon 1 | 543 | Cy2 |
| Helium-Neon 2 | 633 | Cy3 |
| Argon | 488 | Cy5 |

(Quelle: www.zeiss.de)

Die digitale Nachbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop 7,0 (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, USA). Helligkeit, Kontrast und Schärfe der Bilder wurden hierbei leicht modifiziert.

4.4.8 Kontrollfärbungen

Als histologische Kontrolle wurden bei jeder Färbung Gewebeschnitte ohne Inkubation mit den primären Antikörpern und ansonsten gleicher Nachweismethode mitgeführt. Bei der anschließenden mikroskopischen Auswertung der Kontrollfärbungen zeigten sich keinerlei Markierungen von Zellstrukturen.

4.4.9 Mikroskopie und Bildgebung

Für die semiquantitative Auswertung wurden in einem ersten Schritt pro Tier 3 Schnitte ausgewählt. Für die Auswertung wurde zunächst der Schnitt mit der größten ischämischen Infarktläsion (Schnitt Nr. 2) mithilfe des Mikroskops Axioplan (Zeiss) detektiert. Von diesem Schnitt ausgehend wurde der jeweils korrespondierende rostrale Schnitt (Nr. 1) sowie der okzipitale Schnitt (Nr. 3) ausgewählt. Für die weitere Analyse wurde mit dem Bildmikroskop Axioplan 2 (Zeiss) in Verbindung mit der Digitalkamera (ORCA-ER, Hamamatsu, Hamamatsu

City, Japan) und der Bildanalyse-Software (Volocity 4.3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) angewendet.

4.4.10 Semiquantitative Auswertung

Zur Schnittorientierung wurde zunächst mit einer 10-fachen Vergrößerung ein Übersichtsbild angefertigt. In einem weiteren Schritt wurde auf diesen Scan ein digitales Raster, ein sogenanntes Multi-Well-Raster (Abb. 7) gelegt, das eine Platzierung der „Regions of interest“ (ROI) mit einer Ausdehnung von 327,4 x 2449,4 μm ermöglichte.

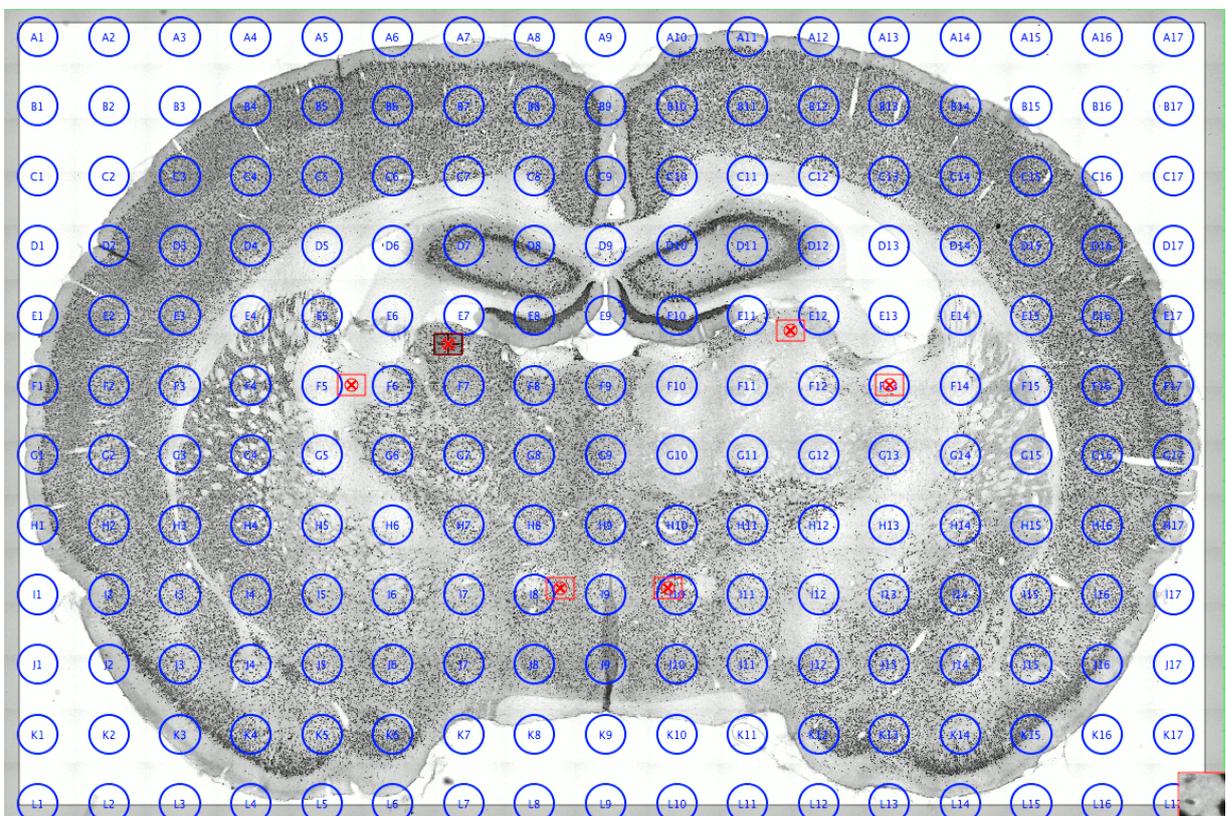


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung eines Rattenhirnschnitts zur Platzierung der ROI. Darstellung eines Rattenhirnschnitts mit darübergelegten digitalen Rastern und der Platzierung der ROI in der ipsilateralen sowie der kontralateralen Hemisphäre.

Folgende Auswahlkriterien für die ROI wurden im Vorfeld festgelegt:

1. Jede ROI muss komplett mit dem Zielgewebe ausgefüllt sein.
2. Das Gewebe innerhalb der ROI muss eine homogene Gewebestruktur aufweisen.
3. ROIs dürfen sich nicht überschneiden.

Die erste ROI wurde direkt in den Infarktkern gelegt, der durch einen maximalen Gewebeschaden mit konsekutivem Verlust der immunhistologischen Färbung definiert war (Bidmon et al., 1997). Die zweite ROI wurde in der ischämischen Zone platziert und durch die substanziell reduzierte immunhistochemische Färbung charakterisiert. In den Randbereich der ischämischen Region, die ischämische Randzone (Neumann-Haefelin et al., 1998) wurde die dritte ROI gesetzt. Die vierte ROI wurde in das primär nicht-ischämisch betroffene Gewebe der ipsilateralen Seite gelegt.

Um eine Aussage über den regionalen Neuronenverlust treffen zu können, wurde auf der kontralateralen, primär nicht betroffenen Seite, jeweils zu den ROI 1 bis 4, eine in Position und Gewebestruktur korrespondierende ROI platziert.

Von jedem der so erhaltenden 4 ROI mit jeweils 1 ROI auf der kontralateralen Seite wurde in einem nächsten Arbeitsschritt in einer 25 fachen Vergrößerung (numerische Apertur 0,8) ein digitales Abbild generiert. Für die weitere Analyse wurden von zwei unabhängigen Auswertern für die Parameter entsprechende Grenzwerte erfasst: Über die Anzahl von Pixeln je Gesichtsfeld und die Einstellungen „find objects by standard deviation“ (Ermittlung von Objekten durch Standardabweichung mit Untergrenze -100 sowie Obergrenze -0,5) sowie „exclude objects by size“ (Ausschluss von Objekten nach Größe) konnte auf die Anzahl von NeuN-positiven Zellen je ROI geschlossen werden. Aus den gewonnen Daten der 3 Schnitte wurde ein Mittelwert errechnet. Durch direkten Vergleich mit der jeweiligen kontralateralen Hemisphäre konnte eine Aussage zum Neuronenverlust getroffen werden.

5. Ergebnisse

Das angewandte thrombembolische Modell induzierte eine fokale zerebrale Ischämie, die zu räumlich variablen Infarkten im Versorgungsgebiet der rechten Arteria cerebri media führte. Der daraus resultierende Neuronenverlust wurde auf Grundlage von NeuN-Immunperoxidasefärbung semiquantitativ erfasst (Abb.7).

Im Ischämiekern, der durch vollständig zerstörtes Gewebe charakterisiert ist (Abb.7 A), wurde keine NeuN-Immunreaktivität nachgewiesen. Ein vollständiger Neuronenverlust wurde als maximaler Schaden angesehen und in der Folge mit dem Wert Null versehen. Als Konsequenz ergaben sich daraus bei der nachfolgenden Gegenüberstellung mit der gesunden kontralateralen Hemisphäre negative Werte. Das weniger geschädigte Gewebe der ischämischen Zone zeichnete sich durch einen starken Neuronenverlust aus (Abb.8 B). Im Randbereich der weiter vom Ischämiekern entfernten, ischämischen Randzone (Abb.8 C), konnte immer noch ein geringer Neuronenverlust nachgewiesen werden. Das von der Ischämie nicht-betroffene Gebiet zeigte im Vergleich zur kontralateralen Seite keinen Neuronenverlust (Abb.8 A'-D').

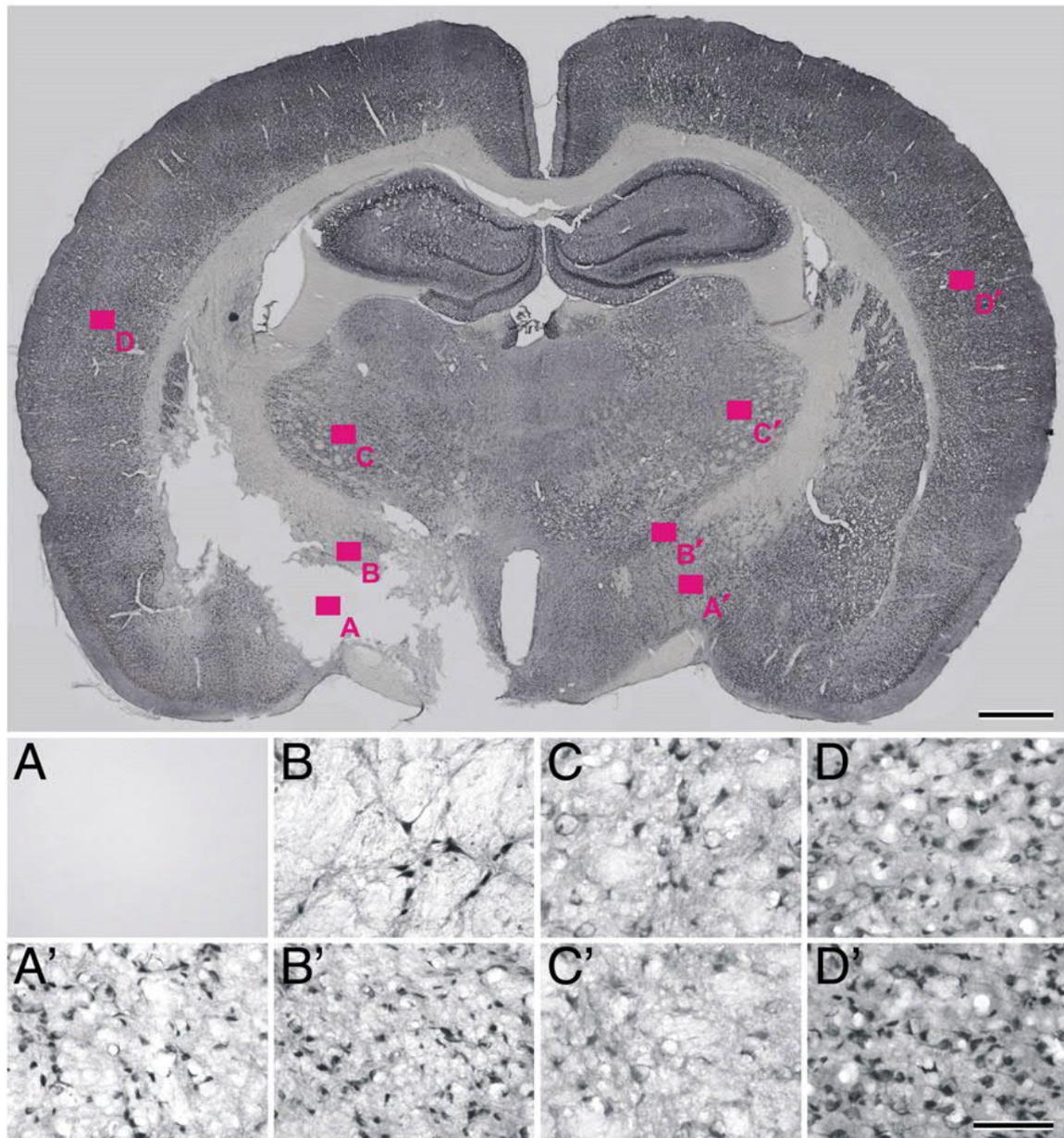


Abbildung 8: Immunperoxidasefärbung neuronaler Zellen. Übersichtsaufnahme in 10-facher Vergrößerung mit den gesetzten ROIs auf ipsilateraler Seite und kontralateraler Hemisphäre in 10-facher Vergrößerung. Detailaufnahmen in 25-facher Vergrößerung zeigen repräsentativ NeuN-positiven Zellen (A) im Infarktkern, (B) in der ischämischen Zone, (C) in der ischämischen Randzone und (D) im nicht-betroffenen Gebiet sowie auf der kontralateralen Hemisphäre (A'-D'). Maßstäbe in der Übersichtsaufnahme = 1 mm, in D' (gültig auch für A-D sowie A'-C') = 75 μ m. Übernommen aus Hobohm et al. (2011).

5.1 Lokalisation der fokal zerebralen Ischämie im Rattenhirn

Für die Erfassung der Infarktlokalisierung in den Rattenhirnen wurde zunächst die Kontrollgruppe untersucht, da in dieser Versuchsgruppe ein beeinflussender Effekt durch die angewendeten Interventionskonzepte ausgeschlossen werden konnte. Von den 12 Tieren in der Kontrollgruppe zeigten 11 Tiere eine Beteiligung der Basalganglien, während bei jeweils 8 Tieren auch Thalamus und Hippokampus betroffen waren. Sieben Tiere zeigten eine Beteiligung der Amygdala. Der Hippokampus war in nur 4 Tieren von einer Ischämie betroffen und der Neokortex wurde in nur 2 Tieren geschädigt (Abb. 9).

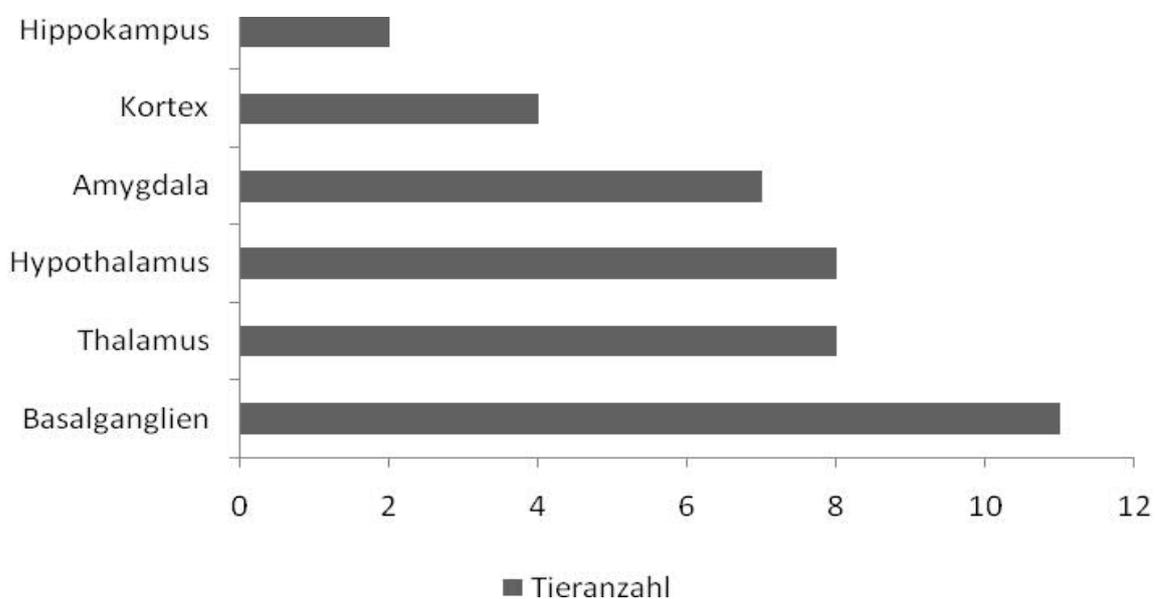


Abbildung 9: Anzahl ischämischer Hirnregionen der Kontrollgruppe. Betroffene Hirnregionen nach experimentell induziertem Schlaganfall im Rattenhirn in der Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe waren in 4 Tieren 2 Hirnregionen bzw. in 3 Tieren 3 Hirnregionen betroffen. Nur von jeweils 2 Tieren wurden 5 bzw. 6 Hirnregionen durch die experimentell induzierte fokal zerebrale Ischämie geschädigt. Bei einem Tier der Kontrollgruppe wurde lediglich 1 Hirnregion durch den Infarkt erfasst (Abb. 10).

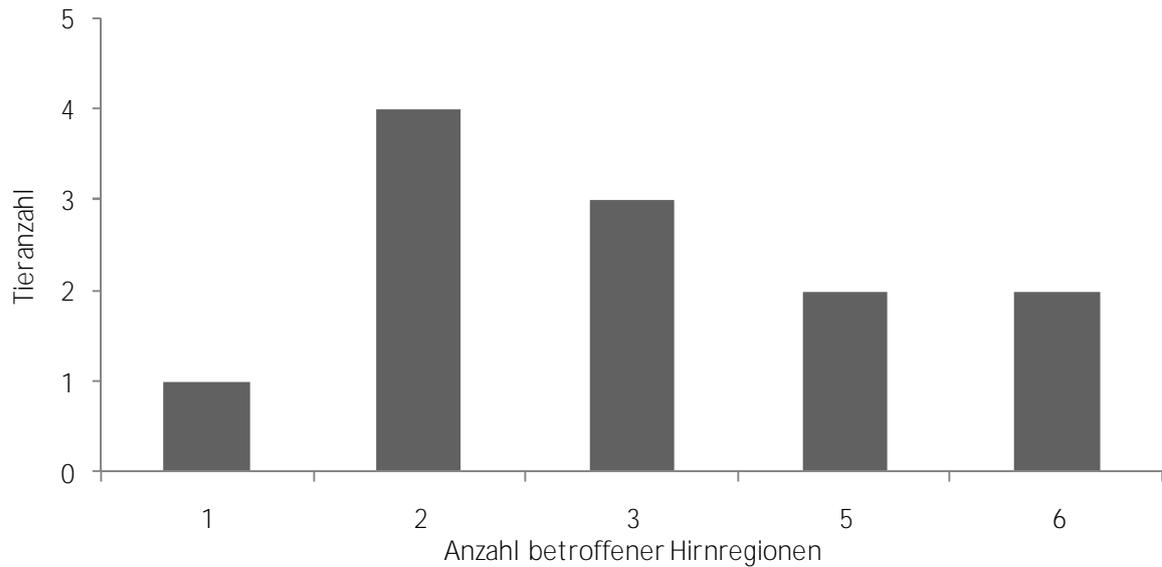


Abbildung 10: Anzahl betroffener Hirnregionen pro Tier. Verteilung der durch experimentell induzierten Schlaganfall geschädigten Hirnregionen der Kontrollgruppe

In der rtPA-Versuchsgruppe waren insgesamt 33 Hirnregionen betroffen. Bei 9 Tieren waren jeweils die Basalganglien und der Hypothalamus geschädigt. Die Amygdala war in 5 Tieren dieser Gruppe betroffen, der Thalamus in weiteren 4 Tieren. Etwas seltener von Infarkten erfasst waren Neokortex und Hippokampus. Demgegenüber wies die rtPA/HBO-Versuchsgruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen den stärksten Schädigungsumfang auf. Von den 12 Versuchstieren zeigten 11 Ischämien in den Basalganglien. Im Thalamus und Hypothalamus sowie der Amygdala waren jeweils 9 Tiere ischämisch geschädigt. Der Neokortex wies in 5 Tieren, der Hippokampus in 3 Fällen eine Ischämie auf.

5.2 Neuronenverlust in Abhängigkeit von zuvor definierten „Regions of Interests“

Der Neuronenverlust wurde für die ausgewählten ROIs semiquantitativ ermittelt. Abb. 11 zeigt die Ergebnisse für die Kontrollgruppe 24 Stunden, 7, 14 und 28 Tage nach Infarkt. Erwartungsgemäß wurde der maximale Neuronenverlust im Infarktkern mit hier vorhandenen maximalen Gewebeschädigungen detektiert. Mit zunehmender Entfernung vom Infarktkern wurde in der Perinfarktregion ein

geringerer Neuronenverlust festgestellt, der sich dabei konstant über den ischämischen Bereich bis zur ischämischen Randzone reduzierte. Sowohl im nicht-betroffenen Gebiet als auch im kontralateralen Gebiet konnte kein Neuronenverlust beobachtet werden. Bei zusätzlicher Berücksichtigung der Zeitachse konnte weiterhin gezeigt werden, dass der vom Infarktkern ausgehende Neuronenverlust schalenförmig verlief.

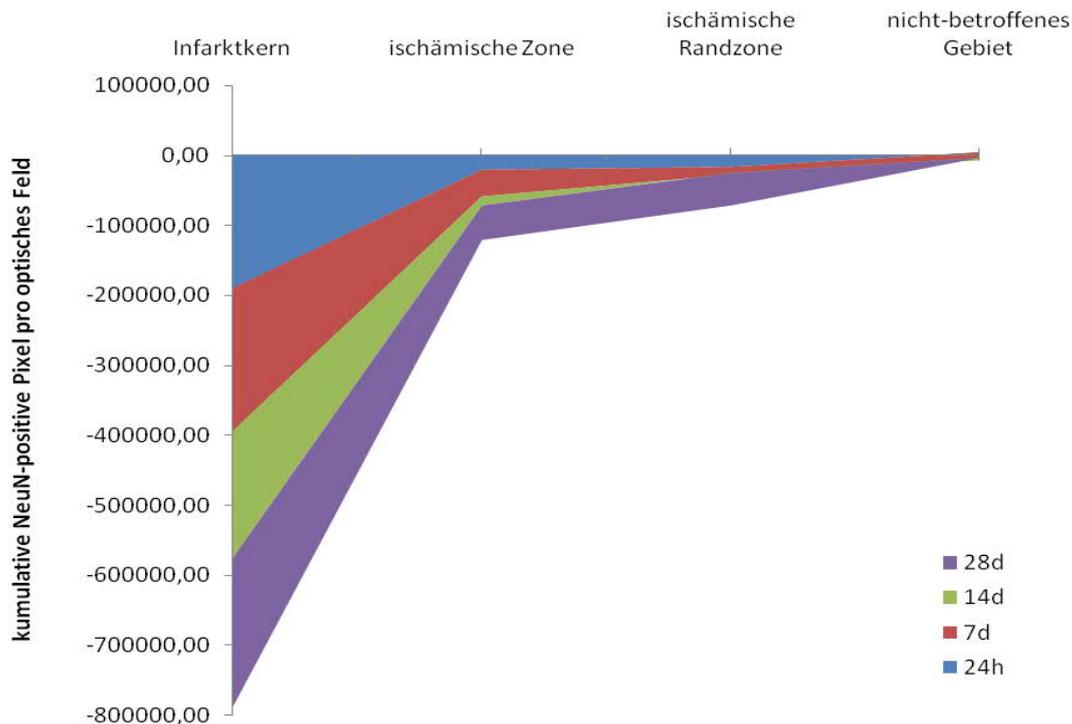


Abbildung 11: NeuN-Markierung in unterschiedlich geschädigten Gebieten. Darstellung der kumulativen NeuN-positiven Pixeln pro optisches Feld innerhalb des Infarktkerns, in der ischämischen Zone, in der ischämischen Randzone und im nicht-betroffenen Gebiet, aufgetragen nach Beobachtungszeitpunkt und Gegenüberstellung zur kontralateralen Hemisphäre.

5.3 Interventionsabhängiger Verlauf des Neuronenverlusts

Im Infarktkern (**Abb. 12**) mit maximalem Neuronenverlust gegenüber den betrachteten ROIs war das Niveau des Verlusts zwischen 24 Stunden und 28 Tagen nach MCAO in beiden Versuchsgruppen und der Kontrollgruppen etwa gleich hoch. 28 Tage nach MCAO zeigte sich ein tendenzieller, jedoch nicht

deutlich geringerer Neuronenverlust in der rtPA/HBO-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

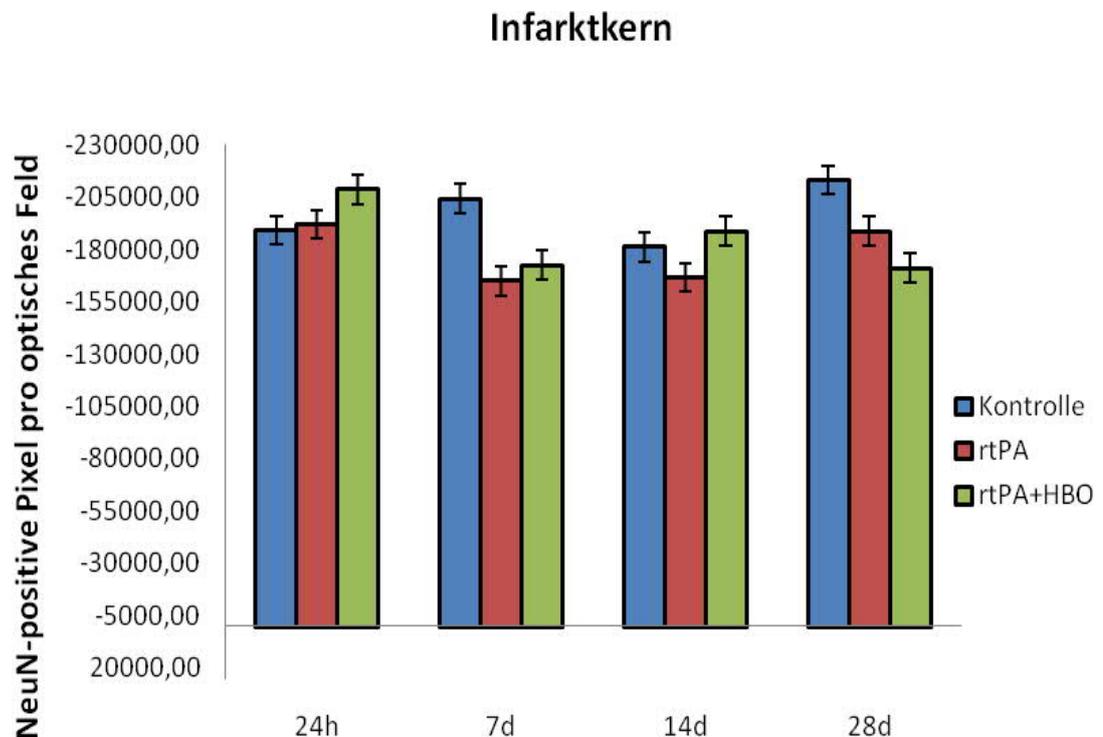


Abbildung 12: NeuN-Markierung im Infarktkern. Darstellung von NeuN-positiven Pixeln pro optisches Feld innerhalb des Infarktkerns im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre in der rtPA-Versuchsgruppe, der rtPA/HBO-Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe, aufgetragen nach Beobachtungszeitpunkt. Symbole = Mittelwerte, Fehlerindikatoren = Standardfehler

In der ischämischen Zone (**Abb.13**) zeigten alle 3 Gruppen während des gesamten Beobachtungszeitraums einen wesentlich geringer ausgeprägten Neuronenverlust als im Infarktkern. Nach 24-stündigem Beobachtungszeitpunkt war kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen rtPA/HBO und rtPA zu finden. Dagegen ergab sich in der Kontrollgruppe 28 Tagen nach MCAO ein leicht erhöhter Neuronenverlust, der sich aber wegen eines geringfügig erhöhten Standardfehlers nicht als deutlich erwies.

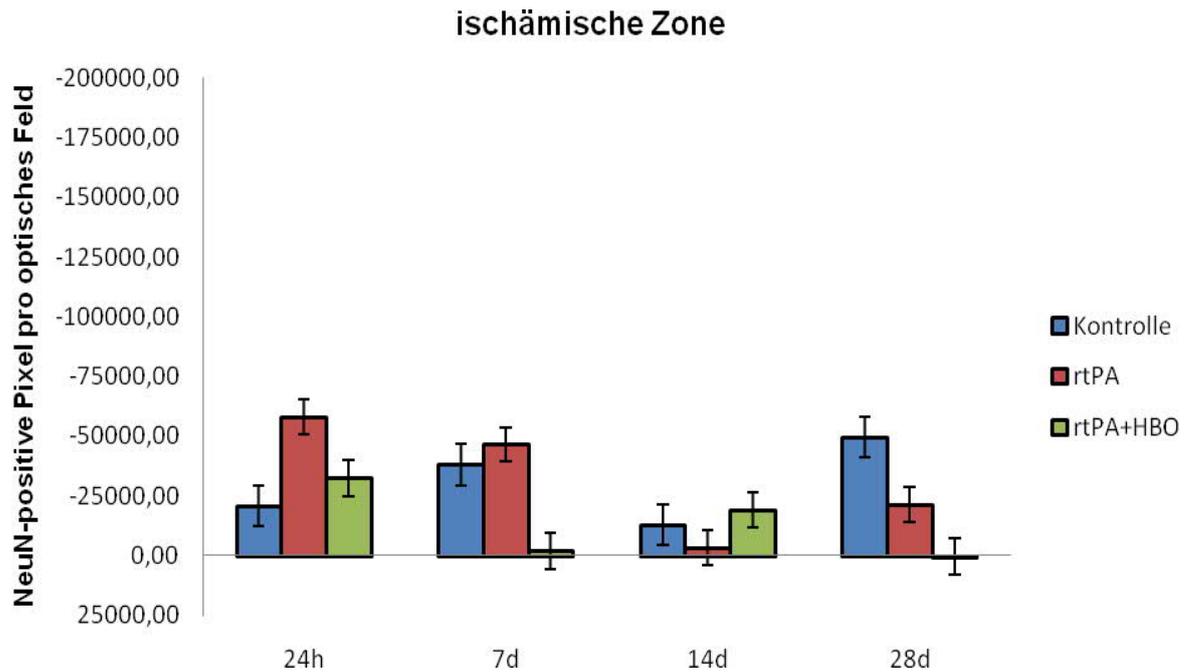


Abbildung 13: NeuN-Markierung in der ischämischen Zone. Darstellung von NeuN-positiven Pixeln pro optisches Feld im Infarktkern, im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre in der rtPA-Versuchsgruppe, der rtPA/HBO-Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe, aufgetragen nach Beobachtungszeitpunkt. Symbole = Mittelwerte, Fehlerindikatoren = Standardfehler

In der ischämischen Randzone (**Abb. 14**) nahm der Neuronenverlust gegenüber der ischämischen Zone nochmals ab und bestätigte die bereits beschriebene schalenartige Konfiguration des Neuronenverlusts um den Infarktkern. Außerdem zeigte sich in der rtPA-/HBO-Versuchsgruppe am Tag 7 eine geringe, transiente Verbesserung des Neuronenverlusts gegenüber der rtPA-Versuchsgruppe, die sich aber bis zum 28. Tag wieder aufhob.

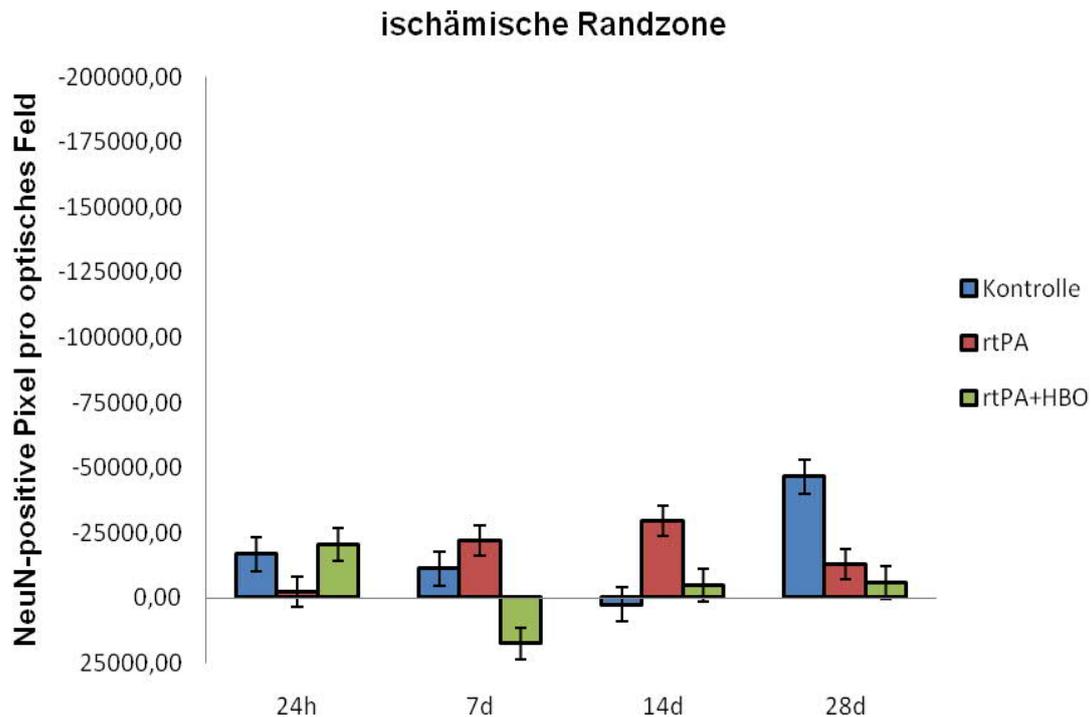


Abbildung 14: NeuN-Markierung in der ischämischen Randzone. Darstellung von NeuN-positiven Pixel pro optisches Feld innerhalb des Infarktkerns im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre in der rtPA-Versuchsgruppe, der rtPA/HBO-Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe, aufgetragen nach Beobachtungszeitpunkt. Symbole = Mittelwerte, Fehlerindikatoren = Standardfehler

Bei den beiden Versuchsgruppen rtPA und rtPA/HBO wies die Randzone wiederum keinen erheblichen Unterschied auf. In der Kontrollgruppe zeigte sich abermals gegenüber den beiden Versuchsgruppen ein etwas erhöhter Neuronenverlust. Im nicht-betroffenen Gebiet konnte kein deutlicher Neuronenverlust festgestellt werden (**Abb.15**); die NeuN-Immunreaktivität lag somit auf dem Niveau der kontralateralen Seite.

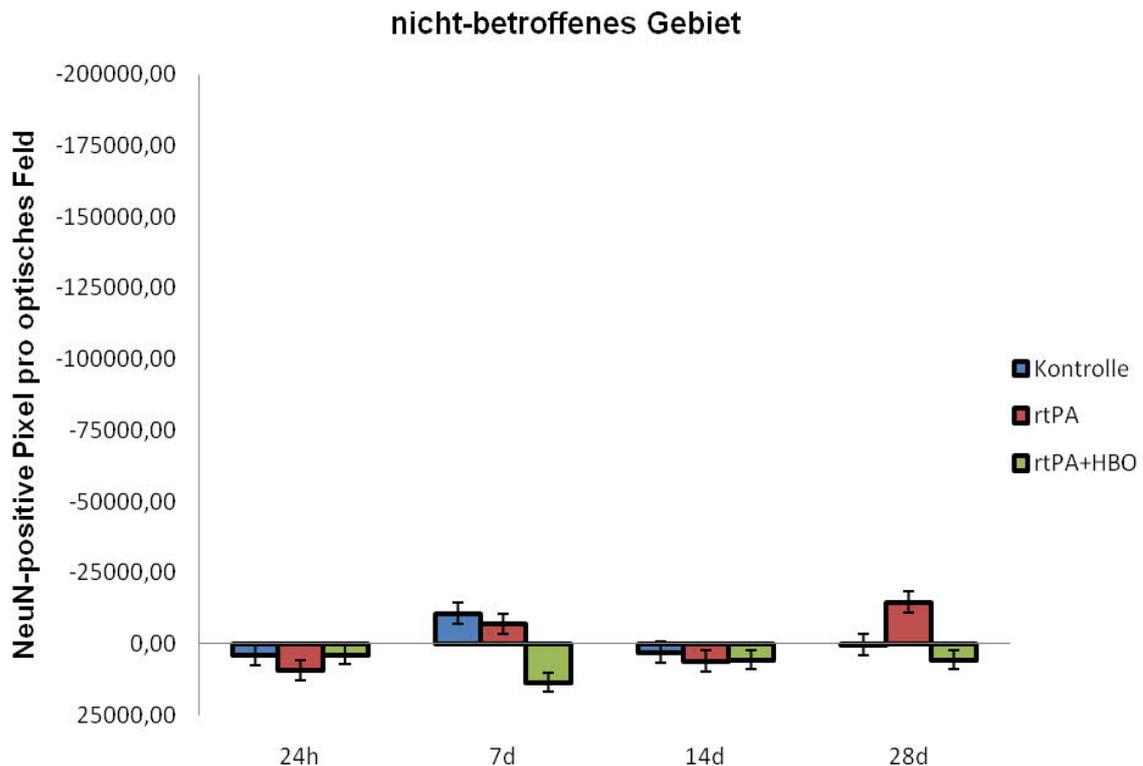


Abbildung 15: NeuN-Markierung im nicht-betroffenen Gebiet. Darstellung von NeuN-positiven Pixeln pro optisches Feld innerhalb des Infarktkerns im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre in der rtPA-Versuchsgruppe, der rtPA/HBO-Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe, aufgetragen nach Beobachtungszeitpunkt. Symbole = Mittelwerte, Fehlerindikatoren = Standardfehler

5.4 Aktivierung von Astro- und Mikroglia in Abhängigkeit vom Neuronenverlust

Im nächsten Untersuchungsschritt wurde der Neuronenverlust im Rahmen der NVU qualitativ analysiert. Neben der NeuN-Immunktivierung wurde zusätzlich die zelluläre Reaktion von Astrozyten und Mikroglia in ischämisch geschädigten Hirnarealen untersucht. Dabei wurden die Zellzahlen der infarzierten Hemisphäre mit denen der kontralateralen Hemisphäre verglichen. Ziel war es, ein besseres Verständnis von Neuronenuntergang und assoziierter Gliose nach thromboembolischer Ischämie zu erhalten. Hierzu wurde die Region 1 des Ammonshorns (Cornu ammonis), d. h. die CA-1 Region des Hippokampus, der Neokortex sowie der Striatumrand eines Kontrolltieres an Tag 28 untersucht.

Abb. 15 belegt einen massiven Neuronenverlust ipsilateral zur fokalen zerebralen Ischämie im Hippokampus (**Abb.16 A`**), einer gegenüber Hypoxie als extrem vulnerabel geltenden Region (Cervós-Navarro und Diemer, 1991; Gozal et al., 2001). Dieses Markierungsmuster unterschied sich vom deutlich sichtbaren Neuronenband, der Körnerzellschicht auf der kontralateralen Seite (**Abb.16 A**). Die durch GFAP-Immunreaktivität detektierten Astrozyten wiesen auf der Infarktseite eine weitreichende Aktivierung auf (**Abb.16 B`**). Iba-1 immunreaktive Mikroglia zeigten eine deutliche Transformation und Aktivierung auf der ipsilateralen Seite (**Abb.16 C`**). Demgegenüber konnte in der korrespondierenden gesunden kontralateralen Seite nur eine geringe Aktivierung der ortsständigen Mikroglia detektiert werden (**Abb.16 C**). Im Überblick, dem „Overlay“, (**Abb.16 D-D`**) sind alle Einzelbilder übereinander gelegt und verdeutlichen die gliale Aktivierung mit dem einhergehenden Neuronenverlust in der geschädigten Hemisphäre (**Abb.16 D`**).

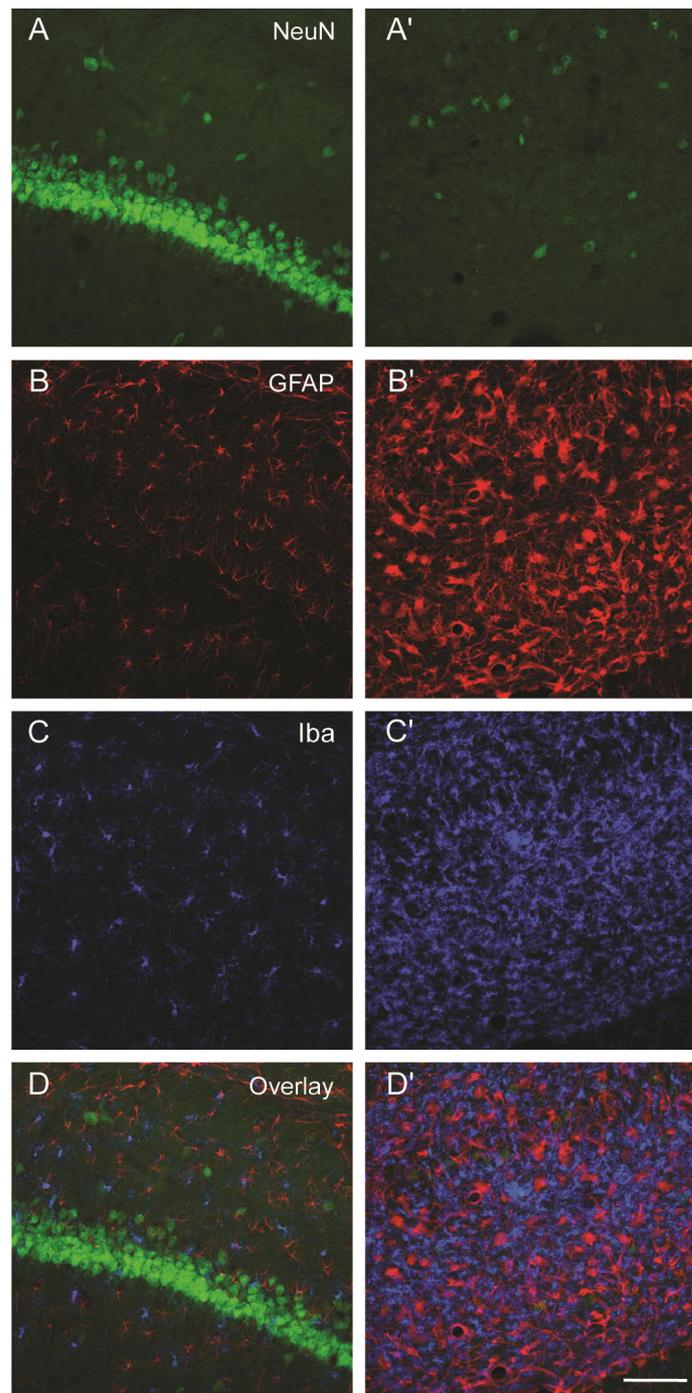


Abbildung 16: Immunfluoreszenz von NeuN, GFAP, Iba im Hippokampus. Simultane Darstellung von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia in der hippocampalen CA1-Region durch konfokale Laserscanningmikroskopie: (A-D) kontralaterale Hemisphäre und (A'-D') ipsilaterale Seite. Markierung von NeuN-Immunreaktivität in Neuronen mit Cy2, grün (A-A'); Visualisierung von GFAP-Immunreaktivität in Astrozyten mit Cy3, rot (B-B'); Detektion von Iba1-Immunreaktivität von Mikroglia mit Cy5, blau farbkodiert (C-C'). Im Overlay (D-D') werden der Neuronenverlust und die Gliose simultan verdeutlicht (D'). Maßstab = 100 µm

Der von fokaler zerebraler Ischämie mitbetroffene Neokortex (**Abb. 17**) zeigte eine deutlich verringerte Immunreaktivität des pan-neuronalen Markers NeuN auf der geschädigten Seite (**Abb.17 A`**), d.h. einen deutlichen Neuronenverlust. Mit starker Aktivierung von Astrozyten (**Abb.17 B`**) und Mikroglia (**Abb.17 C`**) im ischämisch geschädigten Bereich konnte auch im Neokortex eine starke gliale Reaktion dokumentiert werden. Die simultane Darstellung aller Marker (**Abb.17 D-D`**) unterstreicht diesen Befund. Auf der geschädigten ipsilateralen Seite sieht man sowohl eine starke gliale Reaktion als auch erheblichen neuronalen Verlust.

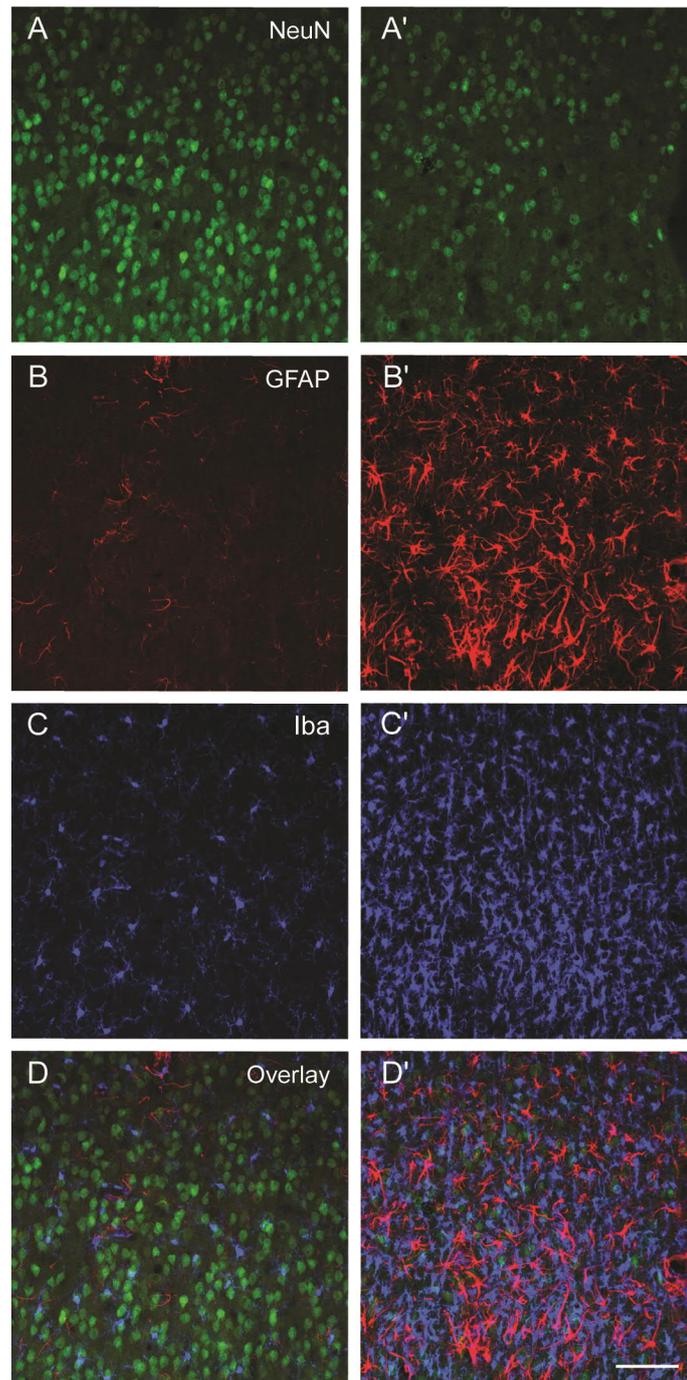


Abbildung 17: Immunfluoreszenz von NeuN, GFAP, Iba im Neokortex. Simultane Darstellung von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia im Neokortex durch konfokale Laserscanningmikroskopie: (A-D) der läsionkontralateralen Hemisphäre und (A'-D') der läsionipsilaterale Seite. Visualisierung von NeuN-Immunreaktivität in Neuronen mit Cy2, grün (A-A'); Detektion von GFAP-Immunreaktivität in Astrozyten mit Cy3, rot (B-B'); Markierung von Iba1-Immunreaktivität von Mikroglia mit Cy5, blau farbkodiert (C-C'). Im Overlay (D-D') sticht nochmals die Gliose im geschädigten Gewebe (D') hervor. Maßstab = 100 µm

Die qualitative Analyse der Dreifachimmunfluoreszenzmarkierung von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia erfolgte auch im Striatum. Durch die Okklusion der rechten Arteria cerebri media mittels MCAO liegt das Striatum charakteristischerweise im primären Infarktbereich (Traystman, 2003). Sichtbar wird der ischämisch geschädigte Bereich des Neuronenverlusts im linken Teil des Bildes (**Abb.18 A**). Die NeuN-Färbung lässt hier eine Reduzierung der neuronalen Zellen in Richtung des ischämisch geschädigten Gewebes erkennen. Wie Hippokampus und Neokortex zeigte auch das Striatum eine starke Aktivierung von Astroglia (**Abb.18 B**) und Mikroglia (**Abb.18 C**), wobei sich die Astrozyten in der ischämischen Randzone zirkulär ausbreiten und die Mikroglia sich eher gleichmäßig im ischämisch geschädigten Gebiet verteilen.

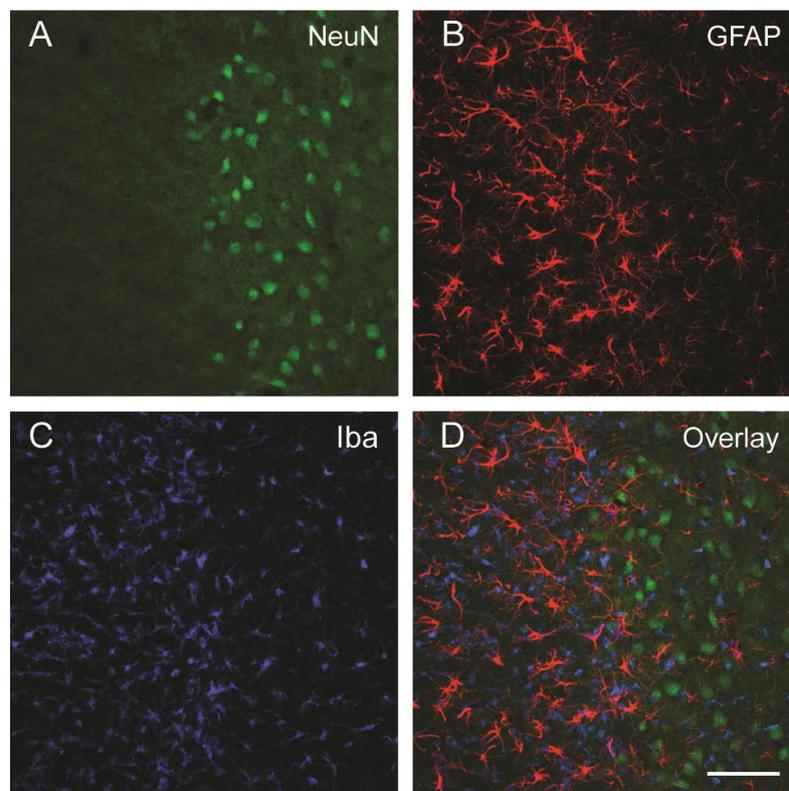


Abbildung 18: Immunfluoreszenz von NeuN, GFAP, Iba im Striatum. Simultane Darstellung von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia im Neokortex durch konfokale Laserscanningmikroskopie: (A-D) läsionkontralaterale Hemisphäre und (A'-D') läsionipsilaterale Seite. Markierung von NeuN-Immunreaktivität in Neuronen mit Cy2, grün (A-A'); GFAP-Immunreaktivität in Astrozyten mit Cy3, rot (B-B'); Iba1-Immunreaktivität von Mikroglia Cy5, blau farbkodiert (C-C'). Im Overlay (D-D') zeigt sich besonders deutlich die Grenze zwischen gesundem und geschädigtem Gewebe (D'). Maßstab = 100 µm

6. Diskussion

In der klinischen Praxis hat sich für die Behandlung des akut ischämischen Schlaganfalls die Thrombolyse mit rtPA als einzig evidentes und kausales Therapiekonzept etabliert (Clark et al., 1999; Clark et al., 2000; Hacke et al., 1995, 1998; Vahedi et al., 2007). Schon zu Beginn der therapeutischen Anwendung wurden neurotoxische Nebenwirkungen von rtPA festgestellt (Harston et al., 2010; Goto et al., 2007; Montagne et al., 2012; Oka et al., 2007). Nachfolgend lag aufgrund fehlender alternativer Therapieansätze der Forschungsschwerpunkt auf der Entwicklung neuer neuroprotektiver Substanzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die gewonnenen Ergebnisse aus dem Blickwinkel des angewendeten thrombembolischen Modells beleuchtet, um diese dann mit dem bereits implementierten Penumbra-Modell in Beziehung zu setzen. Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit war allerdings die anschließende semiquantitative Analyse des Neuronenverlusts im Rattenhirn nach thrombembolisch induzierter Ischämie in Abhängigkeit von den untersuchten Versuchsgruppen. Da die pathophysiologischen Mechanismen nach fokaler zerebraler Ischämie vom jeweiligen betroffenen Gewebetyp abhängen, wurden in der experimentellen Untersuchung auch verschiedene ischämische Zonen im Gehirn verglichen.

Abschließend wurden auf der Grundlage von Dreifachimmunfluoreszenzmarkierungen die Interaktionen von Mikroglia und Astrozyten in Beziehung zum detektierten Neuronenverlust diskutiert. Auch um eine bessere Charakterisierung möglicher postischämischer Effekte wie Neurogenese (Godman et al., 2010; Milosevic et al., 2009; Yang et al., 2008; Zhang, et al., 2011) von HBO zu gewährleisten, wurde Gewebe 4 Wochen nach Ischämie analysiert.

Hierfür wurde die systemische Thrombolyse unter HBO im Vergleich zur alleinigen systemischen Thrombolyse untersucht und mit einer Kontrollgruppe in Gehirnen der Ratte verglichen.

6.1 Translationale Aspekte

Bereits Young et al. (2007) haben die enorme Bedeutung des thrombembolischen Tiermodells für die neurowissenschaftliche Forschung hervorgehoben. Dieses Modell ermöglichte ein verbessertes Verständnis der pathophysiologischer Mechanismen des Schlaganfalls und erlaubt die Erforschung und Testung neuer potenzieller Therapiekonzepte.

Der aktuellen Forschung dienen nach Krafft et al. (2012) Nagetiere aufgrund von ökonomischen und ethischen Gesichtspunkten als die am häufigsten verwendeten Tiermodelle. Neben Gemeinsamkeiten hinsichtlich der zerebrovaskulären Anatomie und Pathophysiologie differieren Nager und Primaten erheblich im Hinblick auf ihr Hirnvolumen und zeigen ein unterschiedliches Verhältnis zwischen grauer und weißer Substanz (Krafft et al., 2012).

Beim in der vorliegenden Arbeit verwendeten thrombembolischen Modell (MCAO) nach Zhang et al. (1997) in der Modifikation nach Küppers-Tiedt (2008) und Michalski et al. (2009) erfolgte der Verschluss der rechten Arteria cerebri media mittels eines Blutclots. Die Clots gelangen in die zerebrale Blutbahn und okkludieren hirnversorgende Gefäße. Die MCAO ist somit durch eine Reduktion des Blutflusses innerhalb eines definierten Areals im Gehirn charakterisiert (Traystman, 2003). Dabei kommt diese Methode der menschlichen Pathophysiologie der zerebralen Ischämie sehr nahe. Achtzig Prozent aller Schlaganfälle lassen sich auf zerebrale Ischämien zurückführen (Feigin et al. 2003), die zu einem großen Teil auf arterio-arterielle, arteriell-thrombotische und kardioembolische Embolien zurückzuführen sind (Foulkes et al., 1988). Zudem können noch weitere pathologische Veränderungen eine Ischämie auslösen. Durch Arteriosklerose sukzessiv verengte hirnversorgende Gefäße können zu einer akuten zerebralen Ischämie führen (Furlan et al., 1980).

Ein weiteres häufig gewähltes Verfahren ist der Gefäßverschluss durch das Einführen eines silikonbeschichteten Nylonfadens. Hierbei wird der Faden sukzessive bis zum Circulus arteriosus cerebri vorgeschoben und transient oder permanent im Gefäß belassen (Koizumi et al., 1986). Für die transiente Verlegung

der Gefäße konnte die Arbeitsgruppe um Hata (2000) nach wiederhergestellter Perfusion beweisen, dass sich beim Fadenmodell der Stoffwechsel in der Penumbra, nicht jedoch im Infarktkern erholen konnte. Wenn hingegen, wie in der vorliegenden Studie, die Rekanalisation des okkludierten Gefäßes und damit verbunden die Reperfusion des minderperfundierten Hirnareals mit dem Thrombolytikum rtPA erreicht wird, ist nicht das gesamte Gefäßversorgungsgebiet, sondern nur die Penumbra ausreichend durchblutet (Hakim, 1998). Anders als bei der fokalen zerebralen Ischämie wird die global zerebrale Ischämie durch den Verschluss von mindestens 2 bis 4 Gefäßen bzw. durch einen Herzstillstand herbeigeführt (Liu und Mc Cullough, 2011).

Die qualitative Auswertung der Infarktlokalisierung ergab für die Kontrollgruppe eine hohe Variabilität der induzierten Ischämie im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media rechts mit einer überwiegenden Beteiligung der Basalganglien. Zudem kommt es in diesem Modell häufig zu einer Schädigung des durch thalamische Äste aus der Arteria communicans posterior versorgten Thalamus und des Hypothalamus (Abb. 9). Durch die hohe Variabilität von Lokalisation und Ausdehnung der Infarktgebiete in den einzelnen Tieren konnten die Daten nicht auf Grundlage eines starren Analyseschemas erhoben werden. Daher wurde von einer automatisierten Auswertung abgesehen und stattdessen eine flexiblere Methode zur Positionierung der ROIs gewählt. Deren Platzierung erfolgte stufenweise mit einem über den gesamten Hirnschnitt gelegten digitalen Raster sowie einer Orientierung anhand anatomischer Strukturen. Die ROIs auf beiden Hemisphären wurden anschließend im infarzierten Bereich der Arteria cerebri media und entsprechend der Infarktausdehnung ausgerichtet.

Trotz der genannten Schwierigkeiten während der Datenerhebung rechtfertigt die enge Korrelation des thrombembolischen Modells zur menschlichen Pathophysiologie der zerebralen Ischämie die Auswahl des Modells. Zudem entspricht gerade die hohe Variabilität innerhalb des Modells (Beech et al., 2000) den vielgestaltigen klinischen Formen zerebraler Ischämien. Wie Kilic und Hermann bereits in ihrer Arbeit aus dem Jahre 1999 beschrieben, eignet sich das hier zur Anwendung gekommene Modell, durch die Verwendung des Blutclots,

insbesondere zur Evaluierung der in dieser Studie durchgeführten Reperfusionstherapie mit rtPA. Kritisch muss jedoch angemerkt werden, dass im Falle von fibrinreichen Clots das vereinzelte Vorkommen einer Autolyse mit anschließender Revaskularisierung anzunehmen ist (Takano et al., 1998).

Nicht außer Acht zu lassen ist, dass trotz zahlreicher Erfolge in Tiermodellen bis auf die Revaskularisierung mit rtPA noch kein neuroprotektives Agens reproduzierbare Ergebnisse in klinischen Studien liefern konnte (Gladstone et al., 2002; Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development, 1999). Die Metaanalyse von Bath et al., aus dem Jahr 2009 belegt, dass 2,4-Disulfophenyl-N-tert-butylNitron (NXY-059) als Antioxidans zwar im Tiermodell einen guten neuroprotektiven Effekt zeigte (Green, und Ashwood, 2005; Sydserff et al., 2002), sich dieser positive Effekt jedoch nicht auf die klinischen Versuche übertragen lässt. Als mögliche Ursachen werden sowohl eine unzureichende Adaptation der O₂-Konzentration bei der Übertragung auf die klinische Studie als auch eine geringe Penetrationsfähigkeit der Substanz ins menschliche Hirngewebe sowie allgemeine Translationsprobleme genannt (Bath et al., 2009).

Auch für das Therapiekonzept der HBO lassen sich in der Literatur einige Translationsdefizite finden. Für Singhal (2007) zählen zu den Ursachen einer mangelhaften Translation des HBO-Konzeptes auf den menschlichen Organismus die verzögerte inhalative Applikation der HBO sowie die ungenaue Übertragung des angelegten Drucks in der Überdruckkammer auf den menschlichen Körper.

Um Fehlerquellen bei der Durchführung von Tiermodellen möglichst auszuschließen, wurden bereits 1999 die STAIR-Kriterien (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) zur Verbesserung der Qualität neuer präklinischer Studien zum akuten Schlaganfall eingeführt (Fisher et al., 2009; Meairs et al., 2006).

Für die vorliegende Arbeit mit dem Hauptziel, einer Validierung neuroprotektiver Effekte der HBO in Kombination mit der evidenten rtPA-Therapie am

Rattenmodell, stellte das thrombembolische Modell trotz seiner beschriebenen Nachteile die Methode der Wahl dar.

6.2 Die Penumbra als potenziell rettbares Hirngewebe

Auf Grundlage der semiquantitativen Analyse der NeuN-positiven Zellen stellt Abb.11 in den Ischämie-assoziierten Gebieten: Infarktkern, ischämische Zone und ischämische Randzone sowie im nicht-betroffenen Gebiet den Neuronenverlust schalenförmig dar. Abb. 11 verdeutlicht zudem innerhalb des Infarktkerns einen besonders massiven Neuronenverlust, der mit zunehmender Entfernung vom Infarktkern stetig abnimmt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie entsprechen dem bereits von Astrup und Mitarbeitern 1981 formulierten Modell der Penumbra. Der Zelluntergang verläuft nach diesem Konzept in den Periinfarktregionen, die an den Infarktkern angrenzen, abhängig von der Durchblutungsrate. Durch experimentelle Studien konnten hierbei im Wesentlichen 2 kritische Schwellenwerte für die zerebrale Durchblutung ermittelt werden. Im Tierversuch an Affen bestimmten Jones et al. (1981) den Funktionsschwellenwert mit reversibler Paralyse bei einer Blutversorgung von 22ml/100g/min und den Infarktschwellenwert mit irreversibler Paralyse bei einem Schwellenwert unter 8ml/100g/min nach einer Gefäßverlegung für 2-3 Stunden. Hossmann (1994) konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass der zerebrale Blutfluss im Infarktkern ca. 20 % unterhalb der normalen Flussrate liegt. Nach Unterschreitung des ersten Schwellenwerts beginnt der neuronale Funktionsverlust, die sogenannte Funktionsschwelle. Nimmt der Blutfluss weiter ab und unterschreitet den zweiten wichtigen Schwellenwert, kommt es zur irreversiblen Schädigung von Zellmembranen mit einhergehendem Zelltod und wird demnach als Infarktschwelle bezeichnet (Hakim, 1998; Heiss, 1992). Für Astrup et al. (1981) charakterisiert der zwischen diesen beiden Schwellenwerten liegende Bereich die ischämische Penumbra.

Diesem Konzept entsprechend wächst das morphologisch geschädigte Areal mit zunehmender Zeit an, während die funktionell gestörte Penumbra mit dem

noch potenziell zu rettenden Gewebe langsam zurückgeht (Astrup et al., 1981, Dirnagl et al., 1999, Iadecola und Ross, 1997, Paciaroni et al., 2009). Die Perfusion in der funktionell gestörten Penumbra einer zerebralen Ischämie ist demnach im Vergleich zum Infarktkern geringer eingeschränkt. Die Perfusion ist zwar weiterhin beeinträchtigt, aber die Zellen sind strukturell noch intakt, und somit bleibt die Kommunikation von Zellen weiter fortbestehen (Hakim, 1987). Das Membranpotential und die zelluläre Überlebensfähigkeit sind in diesem Zustand – abhängig vom nachfolgenden Therapieverlauf – potenziell noch rettbar (Siesjö, 1992).

Dieses vulnerable Gebiet mit potenziell rettbarem Hirngewebe stellt in der modernen Schlaganfallforschung einen wichtigen Angriffspunkt für therapeutische Optionen dar. Ziel der Bemühungen ist es, die Reperfusion des empfindlichen Gewebes wiederherzustellen und durch mögliche neuroprotektive Substanzen und Methoden den neuronalen Zelluntergang zu verhindern. Dafür wichtig ist das grundlegende Verständnis pathophysiologischer Mechanismen innerhalb der ischämischen Penumbra, die in Abhängigkeit von Schädigungsgebiet stark variieren können.

Durch die akute Okklusion eines hirnversorgenden Gefäßes und den daraus resultierenden plötzlich eintretenden Energieverlust werden im Infarktkern nekrotische Prozesse ausgelöst, die zu einem massiven Neuronenverlust führen. Hingegen erfolgt der Zelltod im hypoperfundierten Gebiet innerhalb der Penumbra durch apoptotische Mechanismen (Kametsu et al., 2003).

Gestützt wurden diese Daten durch Arbeiten von Li et al. (1995), in denen DNA-Fragmente als Marker für apoptotische Prozesse nach fokaler zerebraler Ischämie in Mäusen, insbesondere in der Penumbra detektierten. Zudem sahen diese Autoren im programmierten Zelltod eine Ursache für die Ausbreitung des Infarkts.

Als Ursache für den nekrotischen Prozess in stark geschädigten Zellen wurde unter anderem (ADP)-ribose) Polymerase 1 (PARP-1; Chiarugi 2002) identifiziert. Unter ischämischen Bedingungen kann PARP-1, statt seiner ursprünglichen, DNA kontrollierenden Funktion durch NAD⁺- und ATP- Depletion den Zelltod einleiten

(Chiarugi 2002; Endres et al., 1997). Die experimentelle Arbeit von Sairanen und Kollegen (2009) zeigte, dass die Spaltung von PARP-1 durch Caspase 3 vor allem in der Penumbra apoptotische Prozesse auslöst.

Abschließend ist festzuhalten, dass sich bei der Auswertung des Neuronenverlusts vom Infarktkern ausgehend ein schalenförmiges Muster ergab, was mit dem Penumbramodell korrespondiert. Durch die Detektion der Penumbra mithilfe diffusionsgewichteter Sequenzen (DWI) und perfusionsgewichteter Sequenzen (PWI) in der Magnetresonanztomographie (MRT) hat das Konzept Einzug in die klinische Routine gefunden (Donnan und Davis, 2002; Kumar et al., 2009). Die klinische Bedeutung von bildgebenden Verfahren ergab sich durch die Erweiterung des therapeutischen Fensters, bedarf aber zur genaueren Differenzierung zwischen rettbarem und infarziertem Gewebe technischer Entwicklungen (Mishra et al., 2010). Neben der diagnostischen Nutzung des Penumbrakonzepts in den letzten 3 Dekaden erlaubt die Erforschung von biochemischen Grundlagen dieses Modells die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien (Ramos-Cabrer et al., 2011).

6.3 Neuronenverlust in Abhängigkeit von zeitlichen Verlauf und Interventionskonzept

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren vielversprechende Ergebnisse präklinischer Studien mit hyperbarem Sauerstoff. Die Mehrzahl der bereits vorliegenden Untersuchungen, die einen positiven Effekt der HBO zeigten, beschränkte sich auf einen kurzen Beobachtungszeitraum. So untersuchten zum Beispiel Veltkamp et al. (2005) nach 4 Stunden, während Yin und Kollegen (2002) einen Beobachtungszeitraum von 24 Stunden wählten. Hingegen analysierten Lou et al. (2004) und Weinstein et al. (1986) Zeiträume von 7 bis zu 10 Tagen. Bei allen Studien konnte ein reduziertes Infarktvolumen als positiver Effekt der HBO festgestellt werden. Ein längerer Beobachtungszeitraum von bis zu 4 Wochen, der auch in dieser Arbeit gewählt wurde, war lediglich Gegenstand der Arbeit von Yin und Zhang (2005).

Vor allem die positiven Ergebnisse funktioneller Tests in der Vorstudie von Michalski et al. (2009) motivierten zur näheren Analyse von Vorgängen auf zellulärer Ebene. Diese Vorstudie kombinierte erstmals simultan die etablierte systemische Thrombolyse von rtPA mit HBO. Durch die Analyse des Neuronenverlusts in der vorliegenden Arbeit sollte der in der Vorstudie beobachtete positive Effekt von rtPA und HBO in der frühen Phase nach MCAO weiter überprüft werden.

Michalski et al. (2009) untersuchten bei mehr als 80 Ratten über ein Zeitraum bis zu 4 Wochen mehrere funktionelle Parameter. Eingeschlossen waren der Menzies-Score, die Bestimmung des Beam-Walks und der Corner Test. Der Menzies-Score erlaubt z.B. die Evaluierung des neurologischen Defizits durch Verhaltensbeobachtungen und differenziert u.a. von Index 0 (neurologisch unauffällig) bis 4 (schwer geschädigt), charakterisiert durch das Drehen im Kreis zur kontralateralen Seite (Menzies et al., 1992). Des Weiteren wurden die Tiere dem sogenannten Beam-Walk Test unterzogen, bei dem über die zurückgelegte Distanz auf einer speziellen Laufstange und den dabei begangenen Schrittfehler auf das neurologische Defizit geschlossen wird (Schallert et al., 2002). Der Corner Test prüfte schließlich das sensomotorische und posturale System nach fokaler zerebraler Ischämie (Zhang, et al., 2002). Bemerkenswert war, dass bezüglich des Menzies-Scores Tiere in der rtPA/HBO-Versuchsgruppe in der frühen Phase bis hin zum Tag 7 eine Verbesserung zeigten, sich anschließend gegenüber der rtPA-Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe jedoch wieder verschlechterten. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, dass es sich hierbei um einen kombinierten Endpunkt aus vorzeitigem Tod (Menzies Score = 5) und neurologischem Defizit (Menzies Score 0-4) handelte. Zusammenfassend konnte aber der positive Trend der Vorstudie von Michalski et al. (2009) bestätigt werden.

Die Daten der vorliegenden Arbeit konnten keinen deutlichen Unterschied im Neuronenverlust bis 4 Wochen nach MCAO sowie über alle untersuchten Ischämie-assoziierten Gebieten hinweg detektieren. Im Vergleich zur rtPA-Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe wies HBO einen geringeren, jedoch nicht deutlichen Neuronverlust auf.

Die Detektion von Neuronenverlust unterschiedlichen Umfangs nach Ischämie könnte außer dem zeitlichen Faktor eines besonders langen Beobachtungszeitraums auch auf verschiedenartiger methodischer Vorgehensweise beruhen. In diesem Zusammenhang ist deshalb zu diskutieren, ob nicht die Sensitivität der verwendeten Methoden zur Neuronendarstellung, d.h. die NeuN-Immunperoxidase-Färbung, Mehrfach-Fluoreszenzmarkierungen mit NeuN sowie die Markierung des Zellkernmarkers HuC/D, der nur von Neuronen exprimiert wird (Liu et al., 1995; Szabo et al., 1991), als auch S100 β als Marker von Astrozyten (Michalski et al., 2010; van Eldik und Griffin, 1994) ein noch präziseres Abbild der Neuronendegeneration und anderer beteiligter Zellen ermöglichen.

Eine Ursache für die beobachtete geringe Neuroprotektion nach fokaler zerebraler Ischämie könnte am zu niedrigen Umgebungsdruck der eingesetzten HBO liegen, wenngleich von Eschenfelder et al. (2007) eine signifikante Reduktion des neurologischen Defizits und des Infarktolumens im Rattenmodell nach MCAO bei einem atmosphärischen Druck von 2.5 atm und 3.0 atm festgestellt haben, was mit dem in der vorliegenden Arbeit von 2,4 atm vergleichbar ist.

Darüber hinaus müsste bei einer weiteren Druckerhöhung mit einer stetigen Erhöhung der toxischen Nebenwirkungen durch Sauerstoff gerechnet werden (Chavko 1996; Ito et al., 1996). Der geringere Unterschied beim Neuronenverlust in allen 4 untersuchten Ischämie-assoziierten Gebieten der rtPA-Versuchsgruppe, der Kontrollgruppe und der rtPA/HBO-Versuchsgruppe ließ den Schluss zu, dass beim gewählten atmosphärischen Druck von 2,4 atm kein neurotoxischer Effekt vom Sauerstoff ausging. Dies steht allerdings im Widerspruch zu früheren Publikationen (Abu Fanne et al., 2010; Armsted et al., 2010; Wang et al., 2009), in denen ein neurotoxischer Effekt von Sauerstoff postuliert wurde.

Auch der Zeitpunkt der HBO nach operativer MCAO könnte einen möglichen Einfluss auf das Outcome haben. Lou et al, (2004) zeigten eine Verbesserung des neurologischen Outcomes bei HBO bis zu 6 Stunden nach MCAO – im Gegensatz zu einer dramatischen Verschlechterung des klinischen Outcomes, wenn die hyperbare Oxygenierung erst 12 Stunden nach induzierter zerebraler Ischämie

erfolgte. Die in der vorliegenden Studie applizierte HBO 2 Stunden nach Operationsende liegt demnach im therapeutisch günstigen Bereich. Allerdings konnten Yin und Zhang (2005) mit ihren Experimenten an Ratten zeigen, dass bei wiederholter HBO-Gabe auch nach einem späteren Beginn (bis zu 12 Stunden nach Schlaganfall) noch ein positiver Effekt durch ein verbessertes neurologisches Outcome erzielt werden kann.

Des Weiteren zeigen verschiedene Studien, dass sich das neurologische Outcome nach zerebraler Ischämie durch die anschließende HBO verbessert (Beynon et al., 2007; Veltkamp et al., 2000; Zhang et al., 2011). Aufgrund physiologischer Überlegungen wird heute vermutet, dass der erhöhte paO_2 nach dem Prinzip einer verbesserten Diffusion die Mikrozirkulation verbessert (Meirovithz et al., 2007).

Auf makroskopischer Ebene zeigten sich in magnetresonanztomographischen Untersuchungen (Henninger et al., 2006; Schäbitz et al., 2004) und histologischen Analysen (Beynon et al., 2007; Günther et al., 2005; Veltkamp et al., 2006) eine Verkleinerung des Infarktolumens, eine Reduktion des Wassergehalts im Gehirn sowie eine Verringerung des Neuronenverlusts im Hippokampus (Zhang et al., 2011).

Auch auf molekularer Ebene konnte ein positiver Effekt der HBO auf die neuronalen Zellen detektiert werden. So wurde durch Lou et al. (2007) nachgewiesen, dass sich der Glukoseverbrauch im Infarktkern durch HBO deutlich verringern lässt und somit das mitochondriale Transmembranpotenzial länger erhalten bleibt. Damit reduziert sich die Freisetzung von pro-apoptotischen Caspasen (Palzu et al., 2008). Des Weiteren wurde eine Aktivierung der Ionenkanäle, eine Induktion von HIF-1 α (Sun, et al., 2008), die Hochregulierung von Bcl-2 (englisch: B-cell lymphoma 2- Proto-Onkogen; Wada et al., 2001) und Superoxiddismutase sowie eine verminderte Aktivität von Cyclooxygenase 2 und Myeloperoxidase beschrieben (Matachett et al., 2009). Als weiterer neuroprotektiver Effekt war auch die Unterdrückung der proinflammatorischen Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF α nachweisbar (Simsek et al., 2011). Außerdem

wurde beobachtet, dass HBO über die Reduzierung von Laminin-5 und die Blockierung von postthrombotisch aktiven MMP-9 (Rosenberg et al., 1996; Veltkamp et al., 2006) die BBB-Schädigung eindämmt. HBO kann in diesem Zusammenhang darüber hinaus das Membranpotenzial in den Mitochondrien stabilisieren und der Apoptose entgegenwirken (Palzur et al., 2008).

Zusammenfassend konnten die vorliegenden Daten die in Vorstudien angedeuteten neuroprotektiven Effekte der HBO nicht bestätigen. In künftigen Untersuchungen sollte die Analyse den Neuronenverlust verursachende Mechanismen weiter differenziert werden. Von besonderer Bedeutung erscheint hierbei das in Kapitel 6.2 festgestellte schalenartige Schädigungsmuster im Sinne des Penumbra-Modells. Es ist für Folgestudien wichtig, die Neuronendegeneration nach nekrotischen Neuronen z.B. mittels Fluoro-Jade B (Schmued et al., 1996), und nach apoptotischen Zellen durch Detektion ihrer Zellkerne mit der etablierten TUNEL-Methode (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; Chaurriat-Marlangue et al., 1996; Gavrieli et al., 1992) zu differenzieren.

6.4 Interaktionen von Neuronen, Astro- und Mikroglia nach fokaler zerebraler Ischämie

Neben einer Abschätzung des Neuronenverlusts im Rahmen der NVU wurden durch Dreifachimmunfluoreszenzmarkierung zusätzlich Astro- und Mikroglia dargestellt. Dem Konzept der NVU liegt die Auffassung zugrunde, dass die Funktion von Neuronen wesentlich durch die Interaktion mit glialen Komponenten des Gehirns, wie Astro- und Mikroglia, beeinflusst werden (Nedergaard und Dirnagl, 2005; Seifert et al., 2006). Hierbei unterliegen die Zell-Zell-Interaktionen komplexen Regelkreisen, die insgesamt noch unzureichend geklärt sind. Von besonderem Interesse war die Adaptationsfähigkeit des geschädigten Hirngewebes in der postischämischen Phase, weshalb Hirnschnitte mit einer möglichst langem Beobachtungszeitpunkt von 4 Wochen gefärbt und analysiert wurden.

Die herausragende Stellung von Astrozyten für das Nervensystem in physiologischer als auch pathologischer Hinsicht wurde in den letzten Jahren immer deutlicher (Kettenmann et al., 1995). Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass Astrozyten in infarzierten Regionen zu einer verstärkten Schädigung des Hirngewebes führen und die Anzahl von proliferierenden Astrozyten häufig mit der Infarktgröße korreliert (Baretto et al., 2011). Nielsen et al. (1997) detektierten bei Astrozyten im Rattenhirn eine erhöhte Expression von Aquaporin 4 (AQP4), d.h. Kanälen für einen erleichterten Wasserdurchtritt durch die Membran mit einer direkten Verbindung zwischen Kapillaren und Pia mater. Diese Kanäle stehen in einer direkten Verbindung zur BBB. Nielsen et al. (1997) postulierten AQP 4 als einen wesentlichen Mediator für die Wasserhomöostase im Gehirn und damit eine Ursache für das Auftreten des prognostisch ungünstigen Hirnödems nach ischämischem Insult. Kimelberg (2005) sah im Anschwellen der Astrozyten unter ischämischen Bedingungen eine weitere Einschränkung der Astrozytenfunktion, die zugleich zu einer zusätzlichen Verringerung des extrazellulären Raums führt. Neben den bekannten Ursachen für den Zell-Hydrops wie Azidose, herabgesetzte Osmolarität und geschädigte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter führte Kimelberg die sogenannten Volumen regulierte Anionenkanäle VRACs (englisch: volume - regulated anion channels) an. VRACs regen die Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren (englisch: excitatory amino acids = EAA) an; wobei neurotoxisches Glutamat eine besonders wichtige Rolle spielt. Dieser Zustand wird noch durch die reduzierte Aufnahmefähigkeit der Astrozyten aus dem Extrazellularraum durch gestörte exzitatorische Aminosäuretransporter 2 weiter erschwert. Die zügige Entfernung von Glutamat aus dem Extrazellularraum ist für den Funktionserhalt der Neuronen essenziell (Anderson und Swanson, 2000).

Andererseits gibt es auch für neuroprotektive Wirkungen der Astroglia zahlreiche Belege, die von Trendelenburg und Dirnagl (2005) zusammengefasst wurden. Hierbei hervorzuheben sind Regulation und Beschränkung von Entzündungsreaktionen oder die Aufrechterhaltung der Homöostase verschiedener Moleküle im Extrazellularraum (Sofroniew, 2005) sowie die Regulierung des Ionenhaushalts (Simard und Nedergaard, 2004). Astrozyten tragen nach Willis (2011) zur Wiederherstellung der BBB-Integrität bei und dienen als Sauer-

stoffradikalfänger (Sun et al., 2008; Volterra et al., 2004). Darüber hinaus wirken Astrozyten als effektive Sensoren von Mangelzuständen im Gehirn. Jelkmann und Wagner (2004) beschrieben die Wirkung von Erythropoetin (Epo), das von Astrozyten in der postischämischen Phase freigesetzt wird. Epo ist ein neuroprotektiver Faktor und soll Neurone vor Hypoxie und Glutamat induziertem Zelltod schützen (Sieren et al., 2001; Wen et al., 2002). Zudem wirkt Epo auch auf das Endothel, fördert die Neuro- und Angiogenese und setzt Endothelin sowie weitere vasoaktive Substanzen frei. (Wang et al., 2011; Wei et al., 2012). Mithilfe von Magnetresonanztomographie, Konfokalmikroskopie und neurologischen Funktionstests an Ratten konnten Zhang und Kollegen (2000) in einer Spätphase der Ischämie (nach 48 Stunden) eine erhöhte Angiogeneserate durch den auch von Astrozyten freigesetzten Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (Vascular endothelial growth factor = VEGF) innerhalb des Infarkts nachweisen. Nach Zhang et al., (2000) kann VEGF in einer frühen Phase der Ischämie, d.h. 1 Stunde nach Schlaganfall, jedoch auch zu einer schlechteren Permeabilität der BBB und damit zu einer Verstärkung des Hirnödems führen.

Bei den pathophysiologischen Prozessen während der fokalen zerebralen Ischämie spielen auch die Mikroglia eine wesentliche Rolle. Die aus dem Mesoderm (Ling und Wong, 1993) und/oder von Monozyten abstammende Mikroglia werden im geschädigten Hirngewebe dabei auch wesentlich durch Interaktionen mit Neuronen und Astrozyten aktiviert (Nakajima und Kohsaka, 2001). Mit ihrer Aktivierung transformieren sich die Mikrogliazellen vom verzweigten, sogenannten ramifizierten, Zustand in eine amöboide Form (Graeber und Streit 2010).

In ihrer amöboiden Form wirken Mikroglia durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Freisetzung zum Beispiel von IL-1 β (Mabuchi et al., 2000), IL-6 sowie TNF- α (Lambertsen et al., 2005) schädigend auf Neurone (Hanisch 2002, Kettenmann et al. 2011).

Auf der anderen Seite postulierten Streit et al. (2002; 2005) neuroprotektive Mechanismen von Mikrogliazellen. Die Arbeitsgruppe um Imai (2007) konnte für

Mikroglia einen neuroprotektiven Effekt nach globaler Ischämie im Gehirn nachweisen: Nach Applikation exogener Mikroglia in die Arteria subclavia von Rennmäusen mit simultaner Reperfusion des ischämischen Gebiets der hippocampalen CA1-Region wurde eine erhöhte Zahl von überlebenden Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Einschränkend ist allerdings anzumerken, dass es bei Detektion der Mikroglia mit Antikörpern gegen das kalziumbindende Protein Iba-1 (Ito et al., 1998) auch zur Markierung von neutrophilen Granulozyten kommen kann (Matsumoto et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit zeigte die CA1-Region der geschädigten Hemisphäre nach experimentell induziertem Schlaganfall einen fast vollständigen Neuronenverlust. Zudem wurde auf der geschädigten Hemisphäre im Vergleich zur gesunden Seite eine starke Aktivierung von Astro- und Mikroglia registriert (Abb. 16). Bereits die Studie von Kato et al. (1994) hatte ein ähnliches Muster von Neuronenverlust und Gliaaktivierung im Hippokampus gezeigt. Hierbei waren Wüstenrennmäuse zunächst für 2 Minuten einer Ischämie des Gehirns ausgesetzt worden, gefolgt von einer weiteren 3-minütigen Ischämie 3 Tage später. Anschließend wurden Astrozyten durch GFAP-Immunmarkierung dargestellt, während die Detektion von Mikroglia lektinhistochemisch mit dem Isolektin B₄ aus der Schwarzbohne *Griffonia simplicifolia* erfolgte. In der besonders vulnerablen CA1-Region wurde nach 2 Tagen neben einer verstärkten Astrogliaproliferation eine vermehrte mikrogliale Aktivierung mit morphologischer Transformation beobachtet. Nach 7 Tagen zeigten sich eine hypertrophe, reaktive Astroglia sowie eine starke Akkumulation von reaktiver phagozytischer Mikroglia. Auch eine weitere, Studie konnte die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia bei gleichzeitiger Degeneration von Neuronen der hippocampalen CA1-Region bestätigen (Lee et al., 2010).

Das im geschädigten Hippokampus beobachtete Muster von vermehrtem neuronalen Zelltod in Kombination mit einer Gliaaktivierung ließ sich in der vorliegenden Arbeit auch in den geschädigten Arealen von Striatum und Neokortex nachweisen (Abb.17 und 18).

Liu und Kollegen (2011) stellten in diesem Zusammenhang die bereits durch von Bernhardt und Ramirez (2001) aufgeworfene Frage nach den Wechselwirkungen zwischen Mikroglia und Astrozyten in den Vordergrund. Danach verläuft die Aktivierung der glialen Zellen entsprechend einem genauen räumlich und zeitlichen Muster, wobei die Mikroglia in der Regel vor den Astrozyten aktiviert werden und zur weiteren Astrogliaaktivierung beitragen. Auf molekularer Ebene erfolgt die Kommunikation zwischen den Gliazellen nach Liu et al. (2011) vor allem über IL-1, ATP und den Wachstumsfaktor mit mitogenen Eigenschaften (englisch: Transforming growth factor- β = TGF- β).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass eine singuläre Betrachtung der Neurone die komplexen Mechanismen der fokal zerebralen Ischämie nicht ausreichend erklärt. Um die schädigenden Mechanismen der neurogenerativen Veränderungen und die maßgeblich beteiligte NVU besser verstehen zu können, müssen die Wechselbeziehungen der einzelnen Zellen wie Neurone, Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen zusammenhängend betrachtet werden (Kapitel 1.2.5). Nur aus dem besseren Verständnis solcher komplexen Interaktionen lassen sich neue Therapiekonzepte entwickeln (Lo und Rosenberg, 2009).

7. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Experimentelle Untersuchung des Neuronenverlusts bei fokaler zerebraler Ischämie im Rattenhirn nach Applikation von Gewebefibrinolyse und hyperbarem Sauerstoff

eingereicht von: Félix Jean Jan Laignel

angefertigt am: Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Härtig
(Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung)
Dr. med. Carsten Hobohm
(Klinik und Poliklinik für Neurologie, Department für Innere
Medizin, Neurologie und Dermatologie)

März 2013

Der Schlaganfall ist eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland und die häufigste Ursache erworbener Behinderungen im Erwachsenenalter. Gegenwärtig stellt die systemische Thrombolyse mit rekombinantem Gewebefibrinolyse-aktivator (rtPA) das einzige pharmakologisch evidente und kausale Therapiekonzept nach akuter zerebraler Ischämie dar. Diese Behandlungsoption besteht nur in einem kurzen therapeutischen Zeitfenster und birgt eine Vielzahl an

neurotoxischen Nebenwirkungen. Aus diesem Grund arbeitet die Schlaganfallforschung an der Entwicklung neuer Therapiekonzepte.

In der vorliegenden Arbeit sollte am thrombembolischen Rattenmodell die hyperbare Sauerstofftherapie (HBO) erstmals in Kombination mit rtPA untersucht werden. Motivation hierfür war das aus früheren Studien bekannte neuroprotektive Potenzial der HBO, beispielsweise abgeleitet von einer Verkleinerung des Infarktolumens, der Verringerung des Neuronenverlusts und der Verminderung der BBB-Schädigung und inflammatorischen Antwort. Anhand der rtPA/HBO-Versuchsgruppe sollte am thrombembolischen Schlaganfallmodell untersucht werden, inwieweit der resultierende Neuronenverlust vermindert werden kann.

Für das angewendete thrombembolischen Modell wurde mithilfe von Blutclots die rechte Arteria cerebri media von Wistar-Ratten okkludiert. Um den zeitlichen Verlauf des Neuronenverlusts darzustellen, wurden alle Versuchsgruppen (rtPA-Versuchsgruppe, rtPA/HBO-Versuchsgruppe, Kontrollgruppe) zu den Beobachtungszeitpunkten 24 Stunden, 7, 14 sowie 28 Tagen untersucht. In ausgewählten Gehirnschnitten wurden in 4 verschiedenen Infarkt-assoziierten Gebieten Neuronenkerne durch Immunperoxidase-Färbung mit dem pan-neuronalen Marker NeuN detektiert. Der Neuronenverlust wurde durch den Vergleich zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hemisphäre bestimmt. Der rtPA/HBO-Gruppe wurde eine Versuchsgruppe mit ausschließlicher Applikation von rtPA sowie eine Kontrollgruppe ohne Therapie gegenübergestellt. Um die Veränderungen der Neurovaskulären Einheit (NVU) darzustellen, wurde mithilfe einer Dreifachimmunfluoreszenzfärbung neben der qualitativen Darstellung des Neuronenverlusts sowohl die Astroglieose als auch die Mikrogliaaktivierung nach Ischämie erfasst.

Die Untersuchungen ergaben für den neuronalen Schaden in den ausgewerteten Ischämie-assoziierten Gebieten ein schalenförmiges Muster. Eine detaillierte Analyse zeigte im Infarktkern den größten Neuronenverlust und gleichzeitigen strukturellen Gewebeschaden, während in Richtung der Periinfarktregion der neuronale Verlust abnahm. Dieses schalenförmige Muster entspricht dem von Astrup 1981 beschriebenen Penumbra-Modell und blieb

während des gesamten Beobachtungszeitraums von 4 Wochen unverändert bestehen.

Durch die Auswertung des Neuronenverlusts konnte der zuvor vermutete neuroprotektive Effekt der HBO nicht bestätigt werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe und der rtPA-Versuchsgruppe zeigte sich in der rtPA/HBO-Versuchsgruppe kein deutlicher Unterschied im Neuronenverlust. Die Analyse der zellulären Veränderungen im Langzeitverlauf von 28 Tagen nach fokal zerebraler Ischämie ergab keinen deutlichen Unterschied zwischen den verglichenen Versuchsgruppen.

Abschließend zeigte die qualitative Analyse der glialen Reaktion in den Ischämie-assoziierten Bereichen von Hippokampus, Striatum und Neokortex eine deutliche Aktivierung von Astro- und Mikroglia, bei gleichzeitigem massiven Neuronenverlust im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre. Die beobachtete Gliose bei gleichzeitigem Neuronenverlust entspricht dabei dem Konzept der NVU mit Wechselbeziehungen zwischen neuronalen, glialen und vaskulären Zellpopulationen.

Wichtige Daten der vorliegenden Arbeit wurden von Hobohm, Laignel et al. (2011) veröffentlicht und einige weitere Ergebnisse fanden Eingang in die Publikation von Michalski et al. (2012). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass noch weitere Anstrengungen unternommen werden müssen, um Substanzen und Verfahren zu entwickeln, die in der Therapie der akuten zerebralen Ischämie als neuroprotektives Agens appliziert werden können. Die schalenförmige Konfiguration der neuronalen Degeneration verdeutlicht die Notwendigkeit einer noch detaillierteren Analyse, z.B. einer weiteren Differenzierung des Neuronenverlusts nach Nekrose und Apoptose. Zudem muss das Verständnis der komplexen Interaktionen zwischen allen an der Pathologie des Schlaganfalls beteiligten Zelltypen weiter untersucht werden.

8. Literaturverzeichnis

Anderson, CM; Swanson, RA (2000): Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32 (1), 1–14.

Armstead, WM; Ganguly, K; Kiessling, JW; Riley, J; Chen, XH; Smith, Douglas H. et al. (2010): Signaling, delivery and age as emerging issues in the benefit/risk ratio outcome of tPA for treatment of CNS ischemic disorders. *J. Neurochem* 113 (2), 303–312.

Bath, PMW; Gray, LJ; Bath, AJG; Buchan, A; Miyata, T; Green, AR (2009): Effects of NXY-059 in experimental stroke: an individual animal meta-analysis. *Br J Pharmacol* 157 (7), 1157–1171.

Baughman, VL; Hoffman, WE; Miletich, DJ; Albrecht, RF; Thomas, C (1988): Neurologic outcome in rats following incomplete cerebral ischemia during halothane, isoflurane, or N₂O. *Anesthesiology* 69 (2), 192–198.

Becker, KJ (1998): Inflammation and acute stroke. *Curr Opin Neurol* 11 (1), 45–49.

Beech, JS, Williams, CR; Campbell, CA; Bath, PMW; Parsons, AA; Hunter, AJ; Menon, DK (2001): Further characterisation of a thromboembolic model of stroke in the rat. *Brain Res* 895 (1-2), 18–24.

Bernhardi, R. von; Ramirez, G. (2001): Microglia-astrocyte interaction in Alzheimer's disease: friends or foes for the nervous system? *Biol Res* 34 (2), 123–128.

Bidmon, HJ; Wu, J; Buchkremer-Ratzmann, I; Mayer, B; Witte, OW; Zilles, K (1997): Transient changes in the presence of nitric oxide synthases and nitrotyrosine immunoreactivity after focal cortical lesions. *Neuroscience* 82 (2), 377–395.

Bluhmki, E; Chamorro, A; Dávalos, A; Machnig, T; Sauce, C; Wahlgren, N et al. (2009): Stroke treatment with alteplase given 3.0-4.5 h after onset of acute ischaemic stroke (ECASS III): additional outcomes and subgroup analysis of a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 8 (12), 1095–1102.

Boltze, J; Kranz, A; Wagner, DC; Reymann, K; Reiser, G; Hess, DC (2011): Recent advances in basic and translational stroke research. *Expert Rev Neurotherapeutics* 11 (2), 199–202.

Bonfoco, E; Krainc, D; Ankarcrona, M; Nicotera, P; Lipton, SA(1995): Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 92 (16), 7162–7166.

Braun, JS; Jander, S; Schroeter, M; Witte, OW; Stoll, G (1996): Spatiotemporal relationship of apoptotic cell death to lymphomonocytic infiltration in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol* 92 (3), 255–263.

- Candelario-Jalil, Eduardo (2009): Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Curr Opin Investig Drugs* 10 (7), 644–654.
- Caplan, LR (2009): *Caplan's stroke. A clinical approach*. 4. Aufl. Philadelphia: Elsevier, Saunders.
- Cecil, RL; Goldman, L; Schafer, AI (2012): *Goldman's Cecil medicine*. 24. Aufl., Philadelphia: Elsevier, Saunders.
- Cervós-Navarro, J; Diemer, NH (1991): Selective vulnerability in brain hypoxia. *Crit Rev Neurobiol* 6 (3), 149–182.
- Charriaut-Marlangue, C; Margaille, I; Represa, A; Popovici, T; Plotkine, M; Ben-Ari, Y. (1996): Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 (2), 186–194.
- Chen, W; Jadhav, V; Tang, J; Zhang, JH (2008): HIF-1 α inhibition ameliorates neonatal brain injury in a rat pup hypoxic-ischemic model. *Neurobiol Dis* 31 (3), 433–441.
- Choi, DW (1995): Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18 (2), 58–60.
- Clark, WM; Albers, G. W.; Madden, K. P.; Hamilton, S. (2000): The rtPA (alteplase) 0- to 6-hour acute stroke trial, part A. Results of a double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke study investigators*. *Stroke* 31 (4), 811–816.
- Clark, WM; Wissman, S.; Albers, G. W.; Jhamandas, J. H.; Madden, K. P.; Hamilton, S. (1999): Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. *Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke*. *JAMA* 282 (21), 2019–2026.
- Dalton, J (1805). Remarks on Mr. Gough's two essays on the doctrine of mixed gases; and on Professor Schmidt's experiments on the expansion of dry and moist air by heat. *Memoirs of the literary philosophical Society of Manchester* (2), 425–436
- Deb, Prabal; Sharma, Suash; Hassan, K. M. (2010): Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology* 17 (3), 197–218.
- del Zoppo, GJ (2009): Relationship of neurovascular elements to neuron injury during ischemia. *Cerebrovasc Dis* 27 Suppl 1, 65–76.
- del Zoppo, GJ; Milner, R; Mabuchi, T; Hung, S; Wang, X; Berg, GI; Koziol, JA (2007): Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. *Stroke* 38 (2 Suppl), 646–651.
- Dirnagl, U; Iadecola, C; Moskowitz, MA (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22 (9), 391–397.
- Donnan, GA.; Davis, SM (2002): Neuroimaging, the ischaemic penumbra, and selection of patients for acute stroke therapy. *Lancet Neurol* 1 (7), 417–425.

- Donnan, GA; Fisher, M; Macleod, M; Davis, SM. (2008): Stroke Lancet 371 (9624), 1612–1623.
- Doyle, KP; Simon, RP; Stenzel-Poore, MP (2008): Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55 (3), 310–318.
- Endres, M; Engelhardt, B; Koistinaho, J; Lindvall, O; Meairs, S; Mohr, JP et al. (2008): Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis* 25 (3), 268–278.
- Eschenfelder, CC; Krug, R; Yusofi, AF; Meyne, JK; Herdegen, T; Koch, A et al. (2008): Neuroprotection by oxygen in acute transient focal cerebral ischemia is dose dependent and shows superiority of hyperbaric oxygenation. *Cerebrovasc Dis* 25 (3), 193–201.
- Feigin, VL; Lawes, CMM; Bennett, DA; Anderson, CS (2003): Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol* 2 (1), 43–53.
- Fellin, T; Carmignoto, G (2004): Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol (Lond.)* 559 (Pt 1), 3–15.
- Fick, A (1855): Ueber Diffusion. *Ann. Phys. Chem* 170 (1), 59–86.
- Fisher, M; Feuerstein, G; Howells, DW; Hurn, PaD; Kent, TA; Savitz, SI; Lo, EH (2009): Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* 40 (6), 2244–2250.
- Foulkes, MA; Wolf, PA; Price, TR; Mohr, JP; Hier, DB (1988): The Stroke Data Bank: design, methods, and baseline characteristics. *Stroke* 19 (5), 547–554.
- Furlan, AJ; Whisnant, JP; Baker, HL (1980): Long-term prognosis after carotid artery occlusion. *Neurology* 30 (9), 986–988.
- Gavrieli, Y; Sherman, Y; Ben-Sasson, SA (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 (3), 493–501.
- Geocadin, RG; Eleff, Scott M (2008): Cardiac arrest resuscitation: neurologic prognostication and brain death. *Curr Opin Crit Care* 14 (3), 261–268.
- Gill, AL; Bell, CNA (2004): Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM* 97 (7), 385–395.
- Gladstone, DJ; Black, SE; Hakim, AM (2002): Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* 33 (8), 2123–2136.
- Goto, H; Fujisawa, H; Oka, F; Nomura, S; Kajiwara, Koji; Kato, et al. (2007): Neurotoxic effects of exogenous recombinant tissue-type plasminogen activator on the normal rat brain. *J Neurotrauma* 24 (4), 745–752.
- Gozal, E; Row, BW; Schurr, A; Gozal, D (2001): Developmental differences in cortical and hippocampal vulnerability to intermittent hypoxia in the rat. *Neurosci Lett* 305 (3), 197–201.

- Graeber, MB; Streit, WJ (2010): Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119 (1), 89–105.
- Green, AR; Ashwood, T (2005): Free radical trapping as a therapeutic approach to neuroprotection in stroke: experimental and clinical studies with NXY-059 and free radical scavengers. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4 (2), 109–118.
- Hacke, W; Kaste, M; Fieschi, C; Kummer, R von; Davalos, A; Meier, D et al. (1998): Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 352 (9136), 1245–1251.
- Hacke, W; Kaste, M; Fieschi, C; Toni, D; Lesaffre, E; Kummer, R von et al. (1995): Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 274 (13), 1017–1025.
- Hacke, W; Kaste, M; Bluhmki, E; Brozman, M; Dávalos, A; Guidetti, D et al. (2008): Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359 (13), 1317–1329.
- Hakim, AM (1987): The cerebral ischemic penumbra. *Can J Neurol Sci* 14 (4), 557–559.
- Hakim, AM (1998): Ischemic penumbra: the therapeutic window. *Neurology* 51 (3 Suppl 3), 44-46.
- Halterman, MW; Federoff, HJ (1999): HIF-1 α and p53 promote hypoxia-induced delayed neuronal death in models of CNS ischemia. *Exp Neurol* 159 (1), 65–72.
- Hampson, N; Atik, D (2003): Central nervous system oxygen toxicity during routine hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med* 30 (2), 147–153.
- Hanisch, UK (2002): Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40 (2), 140–155.
- Harston, GWJ; Sutherland, BA; Kennedy, J; Buchan, AM (2010): The contribution of L-arginine to the neurotoxicity of recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischemia: a review of rtPA neurotoxicity *J Cereb Blood Flow Metab* 30 (11), 1804–1816.
- Härtig, W; Brückner, G; Holzer, M; Brauer, K; Bigl, V (1995): Digoxigenylated primary antibodies for sensitive dual-peroxidase labelling of neural markers. *Histochem Cell Biol* 104 (6), 467–472.
- Heiss, WD (1992): Experimental evidence of ischemic thresholds and functional recovery. *Stroke* 23 (11), 1668–1672.
- Helton, R; Cui, J; Scheel, JR; Ellison, JA; Ames, C; Gibson, C et al. (2005): Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1 α reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage. *J Neurosci* 25 (16), 4099–4107.
- Henry, W (1803): Experiments on the quantity of gases absorbed by water, at different temperatures, and under different pressures. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 93, 29–274.

- Heuschmann, P; Busse, O; Wagner, M; Endres, M; Villringer, A; Röther, J et al. (2010): Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Akt Neurol* 37 (7), 333–340.
- Hobohm C, Laignel F, Kacza J, Küppers-Tiedt L, Heindl M, Schneider D, Grosche J, Härtig W, Michalski D (2011): Long-lasting neuronal loss following experimental focal cerebral ischemia is not affected by combined administration of tissue plasminogen activator and hyperbaric oxygen. *Brain Res* 1417: 115-126.
- Hossmann, KA (1994): Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36 (4), 557–565.
- Huang, J; Upadhyay, UM; Tamargo, RJ (2006): Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 66 (3), 232–245.
- Iadecola, C (1997): Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 20 (3), 132–139.
- Iadecola, C; Kahles, T; Gallo, EF; Anrather, J (2011): Neurovascular protection by ischaemic tolerance: role of nitric oxide. *J. Physiol. (Lond.)* 589 (Pt 17), 4137–4145.
- Imai, F; Suzuki, H; Oda, J; Ninomiya, T; Ono, K; Sano, H; Sawada, M (2007): Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 27 (3), 488–500.
- Irigoyen, JP; Muñoz-Cánoves, P; Montero, L; Koziczak, M; Nagamine, Y (1999): The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 56 (1-2), 104–132.
- Ito, D; Imai, Y; Ohsawa, K; Nakajima, K; Fukuuchi, Y; Kohsaka, S (1998): Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 57 (1), 1–9.
- Itoh, N; Yonehara, S; Ishii, A; Yonehara, M; Mizushima, S; Sameshima, M et al. (1991): The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66 (2), 233–243.
- Jelkmann, W; Wagner, K (2004): Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Ann Hematol* 83 (11), 673–686.
- Jin, R; Yang, G; Li, G (2010): Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis* 38 (3), 376–385.
- Jones, TH; Morawetz, RB; Crowell, RM; Marcoux, FW; FitzGibbon, SJ; DeGirolami, U.; Ojemann, RG (1981): Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg* 54 (6), 773–782.
- Kametsu, Y; Osuga, S; Hakim, AM (2003): Apoptosis occurs in the penumbra zone during short-duration focal ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 23 (4), 416–422.
- Kato, H; Kogure, K; Araki, T; Itoyama, Y (1994): Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. *Brain Res* 664 (1-2), 69–76.

- Kaur, J; Zhao, Z; Klein, GM; Lo, EH; Buchan, AM (2004): The neurotoxicity of tissue plasminogen activator? *J Cereb Blood Flow Metab*, 945–963.
- Kawamura, S; Yasui, N; Shirasawa, M; Fukasawa, H (1990): Therapeutic effects of hyperbaric oxygenation on acute focal cerebral ischemia in rats. *Surg Neurol* 34 (2), 101–106.
- Kettenmann, H; Hanisch, UK; Noda, M; Verkhratsky, A (2011): Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91 (2), 461–553.
- Kettenmann, H; Ransom, BR (2005): *Neuroglia*. 2nd. Oxford: Oxford University Press.
- Kilic, E; Hermann, DM; Hossmann, KA (2000): Recombinant tissue-plasminogen activator-induced thrombolysis after cerebral thromboembolism in mice. *Acta Neuropathol* 99 (3), 219–222.
- Kim, SU; Vellis, J (2005): Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81 (3), 302–313.
- Kimelberg, HK (2005): Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia* 50 (4), 389–397.
- Koizumi, J; Yoshida, Y; Nakazawa, T; Ooneda, G (1986): A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Experimental studies of ischemic brain edema. Jpn J Stroke* 8:1–8.
- Kolominsky-Rabas, PL; Heuschmann, PU; Marschall, D; Emmert, M; Baltzer, N; Neundörfer, B et al. (2006): Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: The Erlangen Stroke Project. *Stroke* 37 (5), 1179–1183.
- Krafft, PR; Bailey, EL; Lekic, T; Rolland, WB; Altay, O; Tang, J et al. (2012): Etiology of stroke and choice of models. *Int J Stroke* 7 (5), 398–406.
- Kumar, G; Goyal, MK; Sahota, PK; Jain, R (2010): Penumbra, the basis of neuroimaging in acute stroke treatment: Current evidence. *J Neurol Sci* 288 (1-2), 13–24.
- Küppers-Tiedt, L; Michalski, D; Hobohm, C; Schneider, C (2008): Hyperbaric oxygen therapy and thrombolysis in an embolic stroke model in rats– a method description. *Int J Stroke* 3 (Suppl. 1), 459
- Lambertsen, CJ; Dough, RH; Cooper, DY; Emmel, GL; Loeschcke, HH; Schmidt, CF (1953): Oxygen toxicity; effects in man of oxygen inhalation at 1 and 3.5 atmospheres upon blood gas transport, cerebral circulation and cerebral metabolism. *J Appl Physiol* 5 (9), 471–486.
- Lee, JM; Grabb, MC; Zipfel, GJ; Choi, DW (2000): Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 106 (6), 723–731.
- Leist, M; Single, B; Castoldi, AF; Kühnle, S; Nicotera, P (1997): Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185 (8), 1481–1486.

- Li, FTT; Tatlisumak, T; Fisher, M (Hg.) (2006): Handbook of experimental neurology. Methods and techniques in animal research Cambridge: Cambridge University Press, 212-228.
- Li, Y; Chopp, M; Jiang, N; Zaloga, C (1995): In situ detection of DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res Mol. Brain Res* 28 (1), 164–168.
- Lindsberg, PJ; Carpén, O; Paetau, A; Karjalainen-Lindsberg, ML; Kaste, M (1996): Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation* 94 (5), 939–945.
- Ling, EA; Wong, WC (1993): The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7 (1), 9–18.
- Liu, F; McCullough, LD (2011): Middle cerebral artery occlusion model in rodents: Methods and potential pitfalls. *J Biomed Biotechnol* 2011, 1–9.
- Liu, J; Dalmau, J; Szabo, A; Rosenfeld, M; Huber, J; Furneaux, H (1995): Paraneoplastic encephalomyelitis antigens bind to the AU-rich elements of mRNA. *Neurology* 45 (3 Pt 1), 544–550.
- Liu, W; Tang, Y; Feng, J (2011): Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci* 89 (5-6), 141–146.
- Lo, EH; Rosenberg, GA (2009): The Neurovascular unit in health and disease: introduction. *Stroke* 40 (3, Supplement 1), S2.
- Lo, EH; Broderick, JP; Moskowitz, MA (2004): tPA and proteolysis in the neurovascular unit. *Stroke* 35 (2), 354–356.
- Lok, J; Gupta, P; Guo, S; Kim, Woo J; Whalen, MJ; Leyen, K; Lo, EH (2007): Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res* 32 (12), 2032–2045.
- Lou, M; Eschenfelder, CC; Herdegen, T; Brecht, S; Deuschl, G (2004): Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats. *Stroke* 35 (2), 578–583.
- Love, S (1999): Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* 9 (1), 119–131.
- Macrez, R; Ali, C; Toutirais, O; Le Mauff, B; Defer, G; Dirnagl, U; Vivien, D (2011): Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol* 10 (5), 471–480.
- Manev, H; Favaron, M; Guidotti, A; Costa, E (1989): Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharmacol* 36 (1), 106–112.
- Matchett, GA; Martin, RD; Zhang, JH (2009): Hyperbaric oxygen therapy and cerebral ischemia: neuroprotective mechanisms. *Neurol Res* 31 (2), 114–121.
- Matsumoto, H; Kumon, Y; Watanabe, H; Ohnishi, T; Shudou, M; Li, C et al. (2007): Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions. *J Neurosci Res* 85 (5), 994–1009.

- Meairs, S; Wahlgren, N; Dirnagl, U; Lindvall, O; Rothwell, P; Baron, JC et al. (2006): Stroke research priorities for the next decade--A representative view of the European scientific community. *Cerebrovasc Dis* 22 (2-3), 75–82.
- Meirovithz, E; Sonn, J; Mayevsky, A (2007): Effect of hyperbaric oxygenation on brain hemodynamics, hemoglobin oxygenation and mitochondrial NADH. *Brain Res Rev* 54 (2), 294–304.
- Mellor, Howard R; Harris, AL (2007): The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metast Rev* 26 (3-4), 553–566.
- Menzies, S. A; Hoff, J. T; Betz, AL (1992): Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* 31 (1), 100-6; discussion 106-107.
- Mergenthaler, P; Dirnagl, U; Meisel, A (2004): Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 19 (3-4), 151–167.
- Michalski, D; Heindl, M; Kacza, J; Laignel, F; Küppers-Tiedt, L; Schneider, D; Grosche, J; Boltze, J; Löhr, M; Hobohm, C; Härtig, W (2012): Spatio-temporal course of macrophage-like cell accumulation after experimental embolic stroke depending on treatment with tissue plasminogen activator and its combination with hyperbaric oxygenation. *Eur J Histochem* 56:e14
- Michalski, D; Grosche, J; Pelz, J; Schneider, D; Weise, C; Bauer, U et al. (2010): A novel quantification of blood-brain barrier damage and histochemical typing after embolic stroke in rats. *Brain Res* 1359, 186–200.
- Michalski, D; Küppers-Tiedt, L; Weise, C; Laignel, F; Härtig, W; Raviolo, M et al. (2009): Long-term functional and neurological outcome after simultaneous treatment with tissue-plasminogen activator and hyperbaric oxygen in early phase of embolic stroke in rats. *Brain Res* 1303, 161–168.
- Mies, G (1997): Blood flow dependent duration of cortical depolarizations in the periphery of focal ischemia of rat brain. *Neurosci Lett* 221 (2-3), 165–168.
- Milosevic, J; Adler, I; Manaenko, A; Schwarz, SC.; Walkinshaw, G; Arend, M et al. (2009): Non-hypoxic stabilization of hypoxia-inducible factor α (HIF- α): relevance in neural progenitor/stem cells. *Neurotox Res* 15 (4), 367–380.
- Minnerup, J; Sutherland, BA; Buchan, AM; Kleinschnitz, C (2012): Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives. *Int J Mol Sci* 13 (9), 11753–11772.
- Mishra, NK; Albers, GW; Davis, SM; Donnan, GA; Furlan, Anthony J.; Hacke, W; Lees, KR (2010): Mismatch-based delayed thrombolysis: a meta-analysis. *Stroke* 41 (1), e25-33.
- Montagne, A; Hébert, M; Jullienne, A; Lesept, F; Le Béhot, A; Louessard, Morgane et al. (2012): Memantine improves safety of thrombolysis for stroke. *Stroke* 43 (10), 2774–2781.
- Mullen, RJ; Buck, CR; Smith, AM (1992): NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116 (1), 201–211.

- Nedergaard, M; Dirnagl, U (2005): Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* 50 (4), 281–286.
- Nesheim, M; Walker, J; Wang, W; Boffa, M; Horrevoets, A; Bajzar, L (2001): Modulation of fibrin cofactor activity in plasminogen activation. *Ann NY Acad Sci* 936 (1), 247–260.
- Neumann-Haefelin, T; Staiger, JF; Redecker, C; Zilles, K; Fritschy, JM; Möhler, H; Witte, OW (1998): Immunohistochemical evidence for dysregulation of the GABAergic system ipsilateral to photochemically induced cortical infarcts in rats. *Neuroscience* 87 (4), 871–879.
- Neumann-Haefelin, T; Witte, OW (2000): Periinfarct and remote excitability changes after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 (1), 45–52.
- Nielsen, S; Nagelhus, EA; Amiry-Moghaddam, M; Bourque, C; Agre, P; Ottersen, OP (1997): Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17 (1), 171–180.
- O'Collins, VE; Macleod, MR; Donnan, GA; Horkey, LL; van der Worp, BH; Howells, DW (2006): 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann. Neurol* 59 (3), 467–477.
- Oka, F; Fujisawa, H; Nomura, S; Kajiwara, K; Kato, S; Fujii, M et al. (2009): Mechanistic insight into neurotoxicity of tissue plasminogen activator-induced thrombolysis products in a rat intraluminal middle cerebral artery occlusion model. *J Neurotrauma* 26 (9), 1577–1584.
- Olney, JW (1969): Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164 (3880), 719–721.
- Paciaroni, M; Caso, V; Agnelli, G (2009): The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *Eur Neurol* 61 (6), 321–330.
- Palzur, E; Zaaroor, M; Vlodaysky, E; Milman, F; Soustiel, JF (2008): Neuroprotective effect of hyperbaric oxygen therapy in brain injury is mediated by preservation of mitochondrial membrane properties. *Brain Res* 1221, 126–133.
- Paxinos, G; Watson, C (1997): *The rat brain, in stereotaxic coordinates*. Compact 3rd. San Diego: Academic Press.
- Plafki, C; Peters, P; Almeling, M; Welslau, W; Busch, R (2000): Complications and side effects of hyperbaric oxygen therapy. *Aviat Space Environ Med* 71 (2), 119–124.
- Pugh, CW; Ratcliffe, RJ (2003): Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9 (6), 677–684.
- Ratcliffe, PJ (2002): From erythropoietin to oxygen: Hypoxia-inducible factor, hydroxylases and the hypoxia signal pathway. *Blood Purif* 20 (5), 445–450.
- Rosell, A; Ortega-Aznar, A; Alvarez-Sabín, J; Fernández-Cadenas, Israel; Ribó, Marc; Molina, Carlos A. et al. (2006): Increased brain expression of matrix

- metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 37 (6), 1399–1406.
- Rosenberg, GA; Navratil, M; Barone, F; Feuerstein, G (1996): Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 (3), 360–366.
- Rothwell, PM; Algra, A; Amarenco, P (2011): Medical treatment in acute and long-term secondary prevention after transient ischaemic attack and ischaemic stroke. *Lancet* 377 (9778), 1681–1692.
- Schäbitz, WR; Schade, H; Heiland, S; Kollmar, R; Bardutzky, J; Henninger, N et al. (2004): Neuroprotection by hyperbaric oxygenation after experimental focal cerebral ischemia monitored by MRI. *Stroke* 35 (5), 1175–1179.
- Schallert, T; Fleming, SM; Woodlee, MT (2003): Should the injured and intact hemispheres be treated differently during the early phases of physical restorative therapy in experimental stroke or Parkinsonism? *Phys Med Rehabil Clin N Am* 14 (1 Suppl), S27-46.
- Schmued, LC; Albertson, C; Slikker, W (1997): Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 751 (1), 37–46.
- Seckin, M; Gurgor, N; Beckmann, YY; Ulukok, MD; Suzen, A; Basoglu, M (2011): Focal status epilepticus induced by hyperbaric oxygen therapy. *Neurologist* 17 (1), 31–33.
- Seifert, G; Schilling, K; Steinhäuser, C (2006): Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7 (3), 194–206.
- Siesjö, BK (1992): Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 77 (3), 337–354.
- Simard, JM; Kent, TA; Chen, M; Tarasov, KV; Gerzanich, V (2007): Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *The Lancet Neurol* 6 (3), 258–268.
- Simard, M; Nedergaard, M (2004): The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129 (4), 877–896.
- Singhal, AB (2007): A review of oxygen therapy in ischemic stroke. *Neurol Res* 29 (2), 173–183.
- Siren, AL; Fratelli, M; Brines, M; Goemans, C; Casagrande, S; Lewczuk, P et al. (2001): Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (7), 4044–4049.
- Snider, BJ; Gottron, FJ; Choi, DW (1999): Apoptosis and necrosis in cerebrovascular disease. *Ann NY Acad Sci* 893, 243–253.
- Sofroniew, MV (2005): Reactive astrocytes in neural repair and protection. *The Neuroscientist* 11 (5), 400–407.
- Somjen, GG (2001): Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol. Rev* 81 (3), 1065–1096.

- Streit, WJ; Walter, SA; Pennell, NA (1999): Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57 (6), 563–581.
- Streit, WJ (2002): Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40 (2), 133–139.
- Streit, WJ; Conde, JR; Fendrick, SE; Flanary, BE; Mariani, CL (2005): Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurol. Res* 27 (7), 685–691.
- Sun, L; Marti, HH; Veltkamp, R (2008): Hyperbaric oxygen reduces tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 α expression in focal cerebral ischemia. *Stroke* 39 (3), 1000–1006.
- Sun, XL; Zeng, XN; Zhou, F; Dai, CP; Ding, JH; Hu, G (2008): KATP channel openers facilitate glutamate uptake by GluTs in rat primary cultured astrocytes. *Neuropsychopharmacol* 33 (6), 1336–1342.
- Suzuki, YJ; Forman, HJ; Sevanian, A (1997): Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 22 (1-2), 269–285.
- Sydserff, SG; Borelli, AR; Green, AR; Cross, AJ (2002): Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat; studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window. *Br J Pharmacol* 135 (1), 103–112.
- Szabo, A; Dalmau, J; Manley, G; Rosenfeld, M; Wong, E; Henson, J al. (1991): HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell* 67 (2), 325–333.
- Takano, K; Carano, RA; Tatlisumak, T; Meiler, M; Sotak, CH; Kleinert, H. D; Fisher, M (1998): Efficacy of intra-arterial and intravenous prourokinase in an embolic stroke model evaluated by diffusion-perfusion magnetic resonance imaging. *Neurology* 50 (4), 870–875.
- Takano, YS; Harmon, BV; Kerr, JF (1991): Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumour cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. *J Pathol* 163 (4), 329–336.
- Tibbles, PM; Edelsberg, JS (1996): Hyperbaric-oxygen therapy. *N Engl J Med* 334 (25), 1642–1648.
- Traystman, Richard J (2003): Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* 44 (2), 85–95.
- Trendelenburg, G; Dirnagl, U (2005): Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia* 50 (4), 307–320.
- Trump, BF; Berezesky, IK (1996): The mechanisms of calcium-mediated cell injury and cell death. *New Horiz* 4 (1), 139–150.
- Tsujimoto, Y; Shimizu, S; Narita, M (1999). *Nature* 399 (6735), 483–487.
- Tuttolomondo, A; Di Sciacca, R; Di Raimondo, Domenico; Arnao, V; Renda, C; Pinto, A; Licata, G (2009): Neuron protection as a therapeutic target in acute ischemic stroke. *Curr Top Med Chem* 9 (14), 1317–1334.

- van Antwerp, DJ; Martin, SJ; Kafri, T; Green, DR; Verma, IM (1996): Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 274 (5288),787–789.
- van Eldik, LJ; Griffin, WS (1994): S100 β expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim. Biophys Acta* 1223 (3), 398–403.
- Vangeison, G; Carr, D; Federoff, HJ; Rempe, DA (2008): The good, the bad, and the cell type-specific roles of hypoxia inducible factor-1 α in neurons and astrocytes. *J Neurosci* 28 (8), 1988–1993.
- Veltkamp, R; Bieber, K; Wagner, S; Beynon, C; Siebing, DA; Veltkamp C et al. (2006): Hyperbaric oxygen reduces basal lamina degradation after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1076 (1), 231–237.
- Villota, E; Carmona, MT; Rubio, JJ; Andres, S (1981): Equality of the in vivo and invitro oxygen binding capacity of oxgen haemoglobin in patients with severe resperitory disease. *Brit J Anaesth* 53 (12), 1325–1328.
- Volterra, A; Trotti, D; Tromba, C; Floridi, S; Racagni, G (1994): Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* 14 (5 Pt 1), 2924–2932.
- Wada, K; Miyazawa, T; Nomura, N; Tsuzuki, N; Nawashiro, H; Shima, K (2001): Preferential conditions for and possible mechanisms of induction of ischemic tolerance by repeated hyperbaric oxygenation in gerbil hippocampus. *Neurosurgery* 49 (1), 160-166; discussion 166-167.
- Wagner, DC; Riegelsberger, UM; Michalk, S; Härtig, W; Kranz, A; Boltze, J (2011): Cleaved caspase-3 expression after experimental stroke exhibits different phenotypes and is predominantly non-apoptotic. *Brain Res* 1381, 237–242.
- Wahlgren, NG; Ahmed, N (2004): Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies--the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis* 17 Suppl 1, 153–166.
- Wang, L; Chopp, M; Teng, H; Bolz, M; Francisco, MA et al. (2011): Tumor necrosis factor α primes cerebral endothelial cells for erythropoietin-induced angiogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 31 (2), 640–647.
- Wang, Q; Tang, XNan; Yenari, Midori A. (2007): The inflammatory response in stroke *J Neuroimmunol* 184 (1-2), 53–68.
- Wang, XL; Yang, YJ; Xie, M; Yu, XH; Wang, QH(2009): [Hyperbaric oxygen promotes the migration and differentiation of endogenous neural stem cells in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 11 (9), 749–752.
- Ward, A; Payne, KA; Caro, JJ; Heuschmann, PU; Kolominsky-Rabas, PL (2005): Care needs and economic consequences after acute ischemic stroke: The Erlangen Stroke Project. *Eur J Neurol* 12 (4), 264–267.
- Wei, L; Fraser, JL; Lu, ZY; Hu, X; Yu, SP (2012): Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol. Dis* 46 (3), 635–645.

- Weinstein, PR; Anderson, GG; Telles, DA (1987): Results of hyperbaric oxygen therapy during temporary middle cerebral artery occlusion in unanesthetized cats. *Neurosurgery* 20 (4), 518–524.
- Wen, TC; Sadamoto, Y; Tanaka, J; Zhu, PX; Nakata, K; Ma, YJ et al. (2002): Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res* 67 (6), 795–803.
- Willis, CL (2011): Glia-induced reversible disruption of blood-brain barrier integrity and neuropathological response of the neurovascular unit. *Toxicol Pathol* 39 (1), 172–185.
- Yang, YJ; Wang, XL; Yu, XH; Wang, X; Xie, M; Liu, CT (2008): Hyperbaric oxygen induces endogenous neural stem cells to proliferate and differentiate in hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Undersea Hyperb Med* 35 (2), 113–129.
- Yenari, MA; Han, HS (2012): Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci* 13 (4), 267–278.
- Yepes, M; Roussel, BD; Ali, C; Vivien, D (2009): Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci* 32 (1), 48–55.
- Yin, W; Badr, AE; Mychaskiw, G; Zhang, JH (2002): Down regulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model. *Brain Res* 926 (1-2), 165–171.
- Young, AR; Ali, C; Duretête, A; Vivien, D (2007): Neuroprotection and stroke: time for a compromise. *J Neurochem* 103 (4), 1302–1309.
- Zhan, X; Kim, C; Sharp, FR (2008): Very brief focal ischemia simulating transient ischemic attacks (TIAs) can injure brain and induce Hsp70 protein. *Brain Res* 1234, 183–197.
- Zhang, L; Schallert, T; Zhang, ZG; Jiang, Q; Arniago, P; Li, Q et al. (2002): A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Meth* 117 (2), 207–214.
- Zhang, XG; Jiang, Z; Wang, GH; Li, YC; Wang, Yong; Li, X; Shen, HM (2012): Therapeutic efficacy of hyperbaric oxygen on traumatic brain injury in the rat and the underlying mechanisms. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 28 (1), 42–46.
- Zhang, XY; Yang, YJ; Xu, PR; Zheng, XR; Wang, QH; Chen, CF; Yao, Y (2011): The role of β -catenin signaling pathway on proliferation of rats neural stem cells after hyperbaric oxygen therapy in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 31 (1), 101–109.
- Zhang, ZG; Zhang, L; Jiang, Q; Zhang, R; Davies, K; Powers, C et al. (2000): VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 106 (7), 829–838.
- Zhang, Zhenggang; Chopp, Michael; Zhang, Rui Lan; Goussev, Anton (1997): A mouse model of embolic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1081–1088.

Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development (1999). *Stroke* 30 (12), 2752–2758.

Statistisches Bundesamt (Hg.) (2011): *Gesundheit, Todesursachen in Deutschland 2010*. Statistisches Bundesamt Wiesbaden (Fachserie 12 Reihe 4).

Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995). *N Engl J Med* 333 (24), 1581–1587.

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Verwendete Chemikalien | 15 |
| Tabelle 2: Verwendete Lösungen | 16 |
| Tabelle 3: Dreifachimmunfluoreszenzmarkierung..... | 23 |
| Tabelle 4: Technische Daten zur Laserscanning-Mikroskopie | 24 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der ischämischen Kaskade | 2 |
| Abbildung 2 Schematische Darstellung der NVU mit Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktion..... | 8 |
| Abbildung 3: Schematische Übersicht über die Versuchsgruppen | 15 |
| Abbildung 4: Schematische Übersicht des Eingriffs | 18 |
| Abbildung 5: Schematische Übersicht über die gewählten Schnittebenen..... | 20 |
| Abbildung 6: Übersicht über die untersuchten Hirnregionen | 21 |
| Abbildung 7: Exemplarische Darstellung eines Rattenhirnschnitts zur Platzierung der ROI..... | 25 |
| Abbildung 8: Immunperoxidasefärbung neuronaler Zellen | 28 |
| Abbildung 9: Anzahl ischämischer Hirnregionen der Kontrollgruppe | 29 |
| Abbildung 10: Anzahl betroffener Hirnregionen pro Tier | 30 |
| Abbildung 11: NeuN-Markierung in unterschiedlich geschädigten Gebieten | 31 |
| Abbildung 12: NeuN-Markierung im Infarktkern..... | 32 |
| Abbildung 13: NeuN-Markierung in der ischämischen Zone..... | 33 |
| Abbildung 14: NeuN-Markierung in der ischämischen Randzone | 34 |
| Abbildung 15: NeuN-Markierung im nicht-betroffenen Gebiet | 35 |
| Abbildung 16: Immunfluoreszenz von NeuN, GFAP, Iba im Hippokampus..... | 37 |
| Abbildung 17: Immunfluoreszenz von NeuN, GFAP, Iba im Neokortex | 39 |

Abbildung 18: Immunfluoreszenz von NeuN, GFAP, Iba im Striatum..... 40

Lebenslauf

Publikationen

- Michalski, D; Heindl, M; Kacza, J; Laignel, F; Küppers-Tiedt, L; Schneider, D; Grosche, J; Boltze, J; Löhr, M; Hobohm, C, Härtig, W (2012): Spatio-temporal course of macrophage-like cell accumulation after experimental embolic stroke depending on treatment with tissue plasminogen activator and its combination with hyperbaric oxygenation. Eur J Histochem 56:e14
- Hobohm, C; Laignel, F; Kacza, J; Küppers-Tiedt, L; Heindl, M; Schneider, D; Grosche, J; Härtig, W; Michalski, D (2011): Long-lasting neuronal loss following experimental focal cerebral ischemia is not affected by combined administration of tissue plasminogen activator and hyperbaric oxygen. Brain Res 1417: 115-126.
- Michalski, D; Küppers-Tiedt, L; Weise, C; Laignel, F; Härtig, W; Raviolo, M; Schneider, D; Hobohm, C (2009): Long-term functional and neurological outcome after simultaneous treatment with tissue-plasminogen activator and hyperbaric oxygen in early phase of embolic stroke in rats. Brain Res 1303: 161-168.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

Danksagung