

Einfluss unterschiedlicher Dosierungen einer Therapie mit dem Granulozyten Kolonie-stimulierenden Faktor auf die frühe Entzündungsreaktion im murinen Schlaganfallmodell

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Sophie Cerwenka
Geburtsdatum / -ort: 29.05.1991, Freudenstadt

angefertigt am: Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI
Leipzig, Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. Frank Emmrich
Dr. med. Daniel-Christoph Wagner
Dr. med. Gesa Weise

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 18.09.2018

In Gedenken an meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Der Schlaganfall.....	1
1.1.1 Epidemiologie und sozioökonomische Relevanz	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.3 Klinische Symptomatik	2
1.1.4 Rekanalisierende Therapie	2
1.2 Immunologie des Schlaganfalls	3
1.2.1 Das Gehirn als immunprivilegiertes Organ.....	3
1.2.2 Immunantwort nach Schlaganfall	3
1.2.3 Bedeutung neutrophiler Granulozyten für die Immunantwort	6
1.2.4 Rolle des neutrophilen Granulozyten im Schlaganfall	7
1.3 Der Granulozyten Kolonie-stimulierende Faktor	10
1.3.1 G-CSF im Schlaganfall.....	10
1.3.2 Einführung.....	12
1.3.3 Präklinische Schlaganfallstudien mit G-CSF	14
1.3.4 klinische Schlaganfallstudien mit G-CSF.....	14
1.4 Dosistranslation von experimentellen zu klinischen Studien.....	16
2 Zielstellung der Arbeit	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Versuchstiere	18
3.2 Schlaganfallmodell.....	18
3.3 Ein- und Ausschlusskriterien.....	19
3.4 Versuchsplan	20
3.5 Behandlung mit G-CSF.....	21
3.6 Euthanasie und transkardiale Perfusion	22
3.7 Quantifizierung der Leukozytenzahl im Vollblut	23

3.8	Durchflusszytometrische Aufarbeitung.....	23
3.8.1	Lyse- und Färbeprotokoll Blut	23
3.8.2	Isolation von Immunzellen aus dem Maushirn und Färbeprotokoll	24
3.9	Durchflusszytometrische Analyse	25
3.10	Histopathologische Aufarbeitung	26
3.10.1	Anfertigung histologischer Schnitte im Kryostat	26
3.10.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	27
3.10.3	Immunfluoreszenz.....	27
3.10.4	Differenzierung von Granulozyten und Monozyten	29
3.10.5	Immunhistochemische Auszählung.....	29
3.10.6	Darstellung der räumlichen Verteilung	31
3.11	Statistische Auswertung.....	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Durchflusszytometrie	34
4.1.1	Veränderungen des Körper- und Milzgewichts.....	34
4.1.2	Immunzellpopulationen im peripheren Blut	35
4.1.3	Immunzellpopulationen im Hirnisolat.....	38
4.2	Immunhistochemie.....	42
4.2.1	Differenzierung von Monozyten und Granulozyten	42
4.2.2	Quantitative Analyse	43
4.2.2.1	Ipsilateral / kontralateral	44
4.2.2.2	Meningeal / intrazerebral.....	45
4.2.2.3	Rund / stäbchenförmig	46
4.2.3	Räumliche Verteilung der neutrophilen Granulozyten	47
5	Diskussion	51
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	51
5.2	G-CSF und die Einwanderung neutrophiler Granulozyten	53
5.3	G-CSF und die Zusammensetzung des frühen entzündlichen Infiltrats im Gehirn.....	54
5.4	G-CSF und die räumliche Verteilung einwandernder neutrophiler Granulozyten	56

5.5	G-CSF und die Zellmorphologie einwandernder neutrophiler Granulozyten	58
5.6	G-CSF und die periphere bzw. systemische Immunantwort	60
5.7	Methodische Einflussfaktoren und Limitationen der Arbeit	63
5.7.1	Berechnung der murinen Äquivalenzdosis	63
5.7.2	Wahl des Schlaganfallmodells	64
5.7.3	Immunologische Unterschiede zwischen Maus und Mensch.....	65
5.7.4	Methoden und Versuchstierzahl.....	66
5.7.4.1	Durchflusszytometrie	66
5.7.4.2	Immunhistochemie	67
5.8	Ausblick	68
6	Zusammenfassung.....	70
	Literaturverzeichnis	XI
	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	XXVII
	Tabellarischer Lebenslauf	XXVIII
	Publikationen.....	XXIX
	Danksagung.....	XXX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablauf der lokalen Immunantwort im Schlaganfall.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Granulozytenmigration.....	8
Abbildung 3: Immunologische Effekte von G-CSF.	13
Abbildung 4: Nichtimmunologische Effekte von G-CSF.	11
Abbildung 5: Transient Middle Cerebral Artery Occlusion (tMCAO) mit resultierendem Infarktgebiet.....	19
Abbildung 6: Versuchsablauf.....	20
Abbildung 7: Versuchstier in Transportbox vor Euthanasierung und vor Probenentnahme.....	23
Abbildung 8: Gatingschema für Single Cell Gate.	26
Abbildung 9: Schema der indirekten antikörpervermittelten Färbemethode.....	28
Abbildung 10: Prozess der Quantifizierung von neutrophilen Granulozyten nach immunhistochemischer Färbung.....	30
Abbildung 11: Prinzip der Nearest-Neighbor-Analyse und des Voronoi- Diagramms.....	32
Abbildung 12: Darstellung der mittleren Körper- und Milzgewichte.	34
Abbildung 13: Gatingstrategie von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems im peripheren Blut.....	35
Abbildung 14: Gesamtleukozytenzahl und durchflusszytometrische Quantifi- zierung von Zellen des angeborenen Immunsystems im peri- pheren Blut.....	36
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Quantifizierung von Zellen des adaptiven Immunsystems im peripheren Blut.....	37
Abbildung 16: Darstellung der Leukozytensubpopulationen in prozentualen Werten.....	38
Abbildung 17: Gatingstrategie für eingewanderte Zellen des Immunsystems im ischämischen Maushirn.	39
Abbildung 18: Durchflusszytometrische Quantifizierung eingewanderter Leukozyten und neutrophiler Granulozyten im Hirnisolat.	40
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Charakterisierung und Quantifizierung myeloider Zellpopulationen im Hirnisolat anhand der Oberflächenantigene F4/80, Ly6C und MHCII.	41
Abbildung 20: Durchflusszytometrische Quantifizierung von B- und T-Lympho- zyten im Hirnisolat.....	41
Abbildung 21: Differenzierung Gr1-positiver Zellen anhand ihrer Zellkernmor- phologie.....	42
Abbildung 22: Gr1-positive Zellen in Koronarschnitten des Maushirns.	43
Abbildung 23: Anzahl neutrophiler Granulozyten in der ischämischen und kontralateralen Hirnhälfte.	44

Abbildung 24: Verteilung neutrophiler Granulozyten in der ischämischen und kontralateralen Hirnhälfte.	45
Abbildung 25: Zellform neutrophiler Granulozyten in der ischämischen und kontralateralen Hirnhälfte.	46
Abbildung 26: Vergleich der prozentualen Verteilung der Lokalisation runder und stäbchenförmiger Granulozyten in der ischämischen Hirnhälfte.	47
Abbildung 27: Räumliche Verteilung neutrophiler Granulozyten auf der ischämischen Hirnhälfte.	48
Abbildung 28: Voronoi-Diagramme der ischämischen Hirnhälfte.	49
Abbildung 29: Anatomische Strukturen im Koronarschnitt.	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Experimentalgruppe.	21
Tabelle 2: Antikörperübersicht peripheres Blut.....	24
Tabelle 3: Antikörperübersicht Hirn.	25
Tabelle 4: Reagenzien Immunhistochemie.	28

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
AFKO	Autofluoreszenzkontrolle
Akt	Proteinkinase B, Enzym
ANOVA	(engl.) Analysis of Variance, Varianzanalyse
APC	(engl.) Antigen-presenting Cell, antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin, Fluoreszenzfarbstoff
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	(engl.) B Cell Lymphoma 2, B-Zell-Lymphom 2, in Apoptose involviert
BSA	(engl.) Body Surface Area, Körperoberfläche
Ca ⁺	Kalziumion
CCL	(engl.) CC-Chemokine Ligand, CC-Chemokinligand
CD	(engl.) Cluster of Differentiation, Zellunterscheidungssystem
clAP2	(engl.) Cellular Inhibitor of Apoptosis, zelluläre Apoptose-inhibitorische Proteine
CTL	(engl.) Cytotoxic T Cell, zytotoxische T-Zelle
CXCL/R	(engl.) CXC-Chemokin Ligand/Receptor, CXC-Chemokinligand/-rezeptor
Cy7	Cyanin 7, Fluoreszenzfarbstoff
DAMPs	(engl.) Danger or Damage Associated Molecular Patterns, Gefahr oder Schaden assoziierte molekulare Muster
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff zur DNA-Markierung
DWI	(engl.) Diffusion-weighted Imaging, diffusionsgewichtete MRT-Bildgebung
EDTA	(engl.) Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	(engl.) Extracellular Signal-regulated Kinase, spezielle MAP-Kinase, Enzym
EZM	Extrazelluläre Matrix

FACS	(engl.) Fluorescence Activated Cellsorting, fluoreszenzaktiviertes Zellsortieren
Fas	TNF-Rezeptor, der Apoptose auslöst
Fc	konstanter Bestandteil des Immunglobulins
FCS	(engl.) Fetal Calf Serum, fötales Kälberserum
FSC	(engl.) Foreward Scatter, Vorwärtsstreulicht
FITC	Fluorescein Isothiocyanate, Fluoreszenzfarbstoff
FXII	Gerinnungsfaktor XII
g	Beschleunigung der Zentrifuge (Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung)
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor, Wachstumsfaktor
GFAP	(engl.) Glial Fibrillary Acidic Protein, saures Gliafaserprotein
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase, Enzym
HBSS	(engl.) Hank's Balanced Salt Solution
HD	Hochdosis, G-CSF-Therapie
HED	(engl.) Human Equivalent Dose, humane Äquivalenzdosis
HSP	(engl.) Heat Shock Protein, Hitzeschockprotein, DAMP
ICAM-1	(engl.) Inetercellular Adhesion Molecule 1, Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül, CD54
ICD-10	(engl.) International Classification of Diseases, internationale Klassifikation von Krankheiten
IFN	Interferon, Zytokin
IGF	(engl.) Insulin-like Growth Factor, insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin, Zytokin
iNOS	(engl.) Inducible Nitric Oxide Synthase, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, Enzym
JAK	Januskinase, Enzym
kDa	Kilodalton
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
LFA-1	(engl.) Lymphocyte Function-associated Antigen 1, Lymphozyten funktionsassoziiertes Antigen, CD11a/CD18

MAC-1	(engl.) Macrophage-1 Antigen, Makrophagn-1-Antigen, Komplementrezeptor 3, CR3,CD11b/CD18
MAPK	(engl.) Ras/Mitogen-activated Protein Kinase, in Signalkaskade aus Kinasen involviert, Enzym
MCP-1	(engl.) Monocyte Chemotactic Protein 1, Monozyten chemotaktierendes Protein 1, CCL-2
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MHC	(engl.) Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP	(engl.) Macrophage Inflammatory Protein, Makrophagen inflammatorisches Protein, CCL-3/4
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinase, Enzym
mRS	(engl.) Modified Ranking Scale, modifizierte Ranking-Skala, Grad der Behinderung nach einem Schlaganfall
MRT	Magnetresonanztomografie, bildgebendes Verfahren
ND	Niedrigdosis, G-CSF-Therapie
NETs	(engl.) Neutrophil Extracellular Traps, neutrophile extrazelluläre Fallen
NIHSS	(engl.) National Institute of Health Stroke Scale, Schlaganfallskala
NND	(engl.) Nearest Neighbor Distance, nächste Nachbarn, mathematische Methode
NO	Stickoxid
p	Signifikanzniveau
PBS	(engl.) Phosphate Buffered Saline, Pufferlösung
PC7	Phycoerythrin-Cyanin 7, Fluoreszenzfarbstoff
PE	Phycoerythrin, Fluoreszenzfarbstoff
P(E)CAM	(engl.) Platelet (Endothelial) Adhesion Molecule, Thrombozyten Endothel Adhäsionsmolekül
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanin 5.5, Fluoreszenzfarbstoff

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase, Enzym, Signalkaskade
PSGL-1	(engl.) P-Selektin Glycoprotein Ligand 1, P-Selektin Glykoproteinligand
ROI	(engl.) Region of Interest, Interessengebiet
rt-PA	(engl.) Recombinant Tissue-type Plasminogen Activator, rekombinanter gewebsspezifischer Plasminogenaktivator, Alteplase
Schein	Scheinschlaganfall, Operation ohne Ischämie
SDF-1	(engl.) Stromal Cell-derived Factor, aus Stromazellen stammender Faktor 1, CXCL-12
SSC	(engl.) Sideward Scatter, Seitwärtsstreulicht
STAIR	(engl.) Stroke Therapy Industry Academic Roundtable
STAT	(engl.) Signal Transducers and Activators of Transcription, Transkriptionsfaktoren
TF	(engl.) Tissue Factor, Gewebefaktor, Gerinnungsfaktor III, Thromboplastin
TGF	(engl.) Transforming Growth Factor, Transformierender Wachstumsfaktor
Th1/2	Typ1/2-T-Helferzelle
TLR	(engl.) Toll-like-Rezeptor, Toll-ähnlicher Rezeptor
tMCAO	(engl.) Transient Middle Cerebral Artery Occlusion, transienter Verschluss der A. cerebri media
TNF	(engl.) Tumor Necrosis Factor, Tumornekrosefaktor, Zytokin
TOAST	benannt nach der Studie "Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment"
Treg	regulatorische T-Zelle
U	Enzymeinheit, Einheit für Enzymaktivität
VEGF	(engl.) Vascular Endothelial Growth Factor, Gefäßendothel Wachstumsfaktor
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
WHO	(engl.) World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
vs.	versus, gegenübergestellt

1 Einleitung

1.1 Der Schlaganfall

1.1.1 Epidemiologie und sozioökonomische Relevanz

Der Schlaganfall stellt die zweithäufigste Todesursache weltweit dar (WHO 2011) und lag in Deutschland nach Veröffentlichungen des Bundesamtes für Statistik 2014 mit einem Anteil von 1,9 % aller Verstorbenen auf Platz 10 der Todesursachenstatistik (ICD-10: I164). Mit einer Prävalenz von 2,5 % sind in Deutschland rund 1,76 Millionen Menschen im Alter über 18 Jahren von einem Schlaganfall betroffen (Kolominsky-Rabas et al., 2015). Bleibende neurologische Defizite nach einem Schlaganfall stellen die häufigste Ursache erworbener Behinderungen im Erwachsenenalter dar. Drei Monate nach einem Schlaganfall weisen etwa 40 % der Überlebenden schwere Einschränkungen in den Aktivitäten des täglichen Lebens auf (Ward et al., 2005; Schneider et al., 2009; Heuschmann et al., 2011), wodurch die Pflegebedürftigkeit von vorbestehend 16,8 % auf 35,6 % ansteigt (Günster et al., 2011). Enorme Gesundheitskosten sind die Folge. Bereits jetzt werden in den westlichen Industrienationen ca. 2 % bis 5 % der gesamten Gesundheitskosten durch das Krankheitsbild Schlaganfall verursacht (Saka et al., 2009). In den nächsten 20 Jahren werden die direkten Kosten für die Versorgung von Patienten mit erstmaligem Hirninfarkt in Deutschland auf ca. 108 Milliarden Euro geschätzt (Kolominsky-Rabas et al., 2006). Durch eine alternde Bevölkerung ist mit weiter steigenden Fallzahlen und damit einhergehend einer zunehmenden Belastung des Gesundheitssystems durch das Krankheitsbild Schlaganfall zu rechnen (Béjot et al., 2016; Gesundheitsberichterstattung des Bundes).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die den Schlaganfall verursachenden Durchblutungsstörungen lassen sich zu mehr als 80 % auf Gefäßverschlüsse (sogenannte ischämische Hirninfarkte) zurückführen. In 10 % bis 20 % der Fälle ist eine Entkoppelung der Gefäßversorgung durch eine intrazerebrale Blutung ursächlich (Roger et al., 2011). Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit dem ischämischen Hirninfarkt, dessen Ätiologie mithilfe der TOAST-Kriterien in fünf Kategorien unterteilt werden kann (Adams et al, 1993). Dabei hat die Auswertung der deutschen Schlaganfalldatenbank 2001 ergeben, dass zwei Drittel aller Hirninfarkte den drei Hauptursachen kardiale Embolie (25,6 %), Makroangiopathie (20,9 %) und Mikroangiopathie (20,5 %) zugeordnet werden können.

Neben strukturellen Herzveränderungen stellen arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Adipositas und Nikotinabusus die Hauptrisikofaktoren für einen ischämischen Schlaganfall dar (O'Donnell et al., 2010).

1.1.3 Klinische Symptomatik

Die aus dem Gefäßverschluss resultierende Minderversorgung des Hirngewebes mit Sauerstoff und Glukose führt innerhalb von Minuten zu einem Zusammenbruch des Funktions- und Erhaltungsstoffwechsels in dem betroffenen Hirnareal. Als Konsequenz entwickeln sich neurologische Ausfallerscheinungen, die vielgestaltig sind und Rückschlüsse über Lokalisation und Ausdehnung des Infarktgebietes erlauben. Ein sehr häufig betroffenes Gefäß ist die mittlere Hirnarterie. Ihr proximaler Verschluss führt zu einer kontralateralen brachiofazial betonten Hemiparese und einer Hemihypästhesie. Ist die sprachdominante Hemisphäre betroffen, kommen Aphasie und Apraxie hinzu, anderenfalls Anosognosie und Neglect. Zur einheitlichen Erfassung der Symptome eines Schlaganfalls wird die National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) weltweit eingesetzt (Jauch et al., 2013).

1.1.4 Rekanalisierende Therapie

Die kausalen Behandlungsmöglichkeiten beim akuten Schlaganfall sind begrenzt. Innerhalb von 4,5 Stunden nach Symptombeginn kommt die systemische Lyse mit Gewebsplasminogenaktivator (rt-PA) zum Einsatz (Hacke et al., 2008). Bei Verschluss einer großen hirnversorgenden Arterie wie der distalen A. carotis interna oder der proximalen A. cerebri media stellen endovaskuläre Rekanalisationsverfahren seit kurzem das Mittel der ersten Wahl dar. Sie können bis 6 Stunden nach Symptombeginn durchgeführt werden (Berkhemer et al., 2014). Aufgrund des engen Zeitfensters und zahlreicher Kontraindikationen für die intravenöse Lyse, wie unlängst durchgeführte Operationen oder Vorliegen eines Malignoms, erhalten ca. 10 % der Schlaganfallpatienten eine rekanalisierende Therapie (Heuschmann et al., 2010). Insgesamt profitiert also nur ein Bruchteil aller Schlaganfallpatienten von den zugelassenen medikamentösen Therapieverfahren, sodass ein großes Interesse daran besteht, neue Behandlungskonzepte zu entwickeln, die jenseits des bestehenden Zeitfensters eine Behandlung des ischämischen Schlaganfalls erlauben.

1.2 Immunologie des Schlaganfalls

1.2.1 Das Gehirn als immunprivilegiertes Organ

Das Gehirn galt lange Zeit als immunprivilegiertes Organ, das über eine Reihe von Mechanismen verfügt, die der strikten Unterdrückung von potentiell schädlichen Immunreaktionen dienen. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Blut-Hirn-Schranke, die über ein enges Netzwerk aus Endothelzellen, umliegenden Perizyten und Astrozytenausläufern das Eindringen von Immunzellen in das Hirngewebe verhindert (Pardridge et al., 1999; Ballabh et al., 2004). Des Weiteren finden sich kaum antigenpräsentierende Zellen im zentralen Nervensystem und Neurone exprimieren nur eingeschränkt MHC-I-Komplexe (Neumann et al., 1995). Hinzukommend führen fehlende kostimulatorische Signale oder die Bindung an Fas-Rezeptoren zur Apoptose aktivierter infiltrierender T-Zellen (Flügel et al., 2000). Neuere Arbeiten legten jedoch offen, dass ungeachtet aller Schutzmechanismen eine kontinuierliche Überwachung des Gehirns durch streng kontrollierte Einwanderung von Immunzellen stattfindet. So konnten Louveau und Kollegen (2015) zeigen, dass das Gehirn über ein eigenständiges lymphatisches System in den venösen Blutleitern der Meningen verfügt, das von Mikrogliazellen und Subtypen von dendritischen Zellen gesäumt wird (Karman et al., 2004; Greter et al., 2005). Die Beteiligung des Immunsystems an der Entstehung und dem Voranschreiten einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen ist deshalb im vergangenen Jahrzehnt immer mehr in den Vordergrund gerückt.

1.2.2 Immunantwort nach Schlaganfall

Die Unterbrechung der Blutzufuhr bei einem ischämischen Schlaganfall führt innerhalb von Minuten zu einer Minderversorgung der Zellen mit Sauerstoff und Glukose, wodurch es zu einem intrazellulären Mangel an ATP kommt. Der resultierende Funktionsausfall der energieabhängigen neuronalen Ionenpumpen bewirkt einen massiven Flüssigkeitseinstrom in die Zelle mit Ausbildung eines zytotoxischen Zellödems (Michinaga et al., 2015). Neben freier Sauerstoffradikale wird der exzitatorische Neurotransmitters Glutamat (Iadecola et al., 2011) ausgeschüttet, der Kalziumkanäle der postsynaptischen Membran aktiviert und so den Kalziumeinstrom in die Zelle potenziert (Exzitotoxizität). Die folgende Aktivierung Ca⁺⁺-abhängiger Enzyme wie Calpain und Caspasen führt zur Induktion apoptotischer oder nekrotischer Signalwege (Sandoval et al., 2008; Chen et al., 2014). Diese Mechanismen treten zunächst lokal und irreversibel im Infarktkern auf, wo aus Mangel an Kollateralen ein vollständiges Erliegen der Energiezufuhr resultiert. Sie können sich im Verlauf jedoch auf das um-

gebende Randgebiet (Penumbra) ausdehnen und den ischämischen Gewebeschäden vergrößern (Heiss et al., 2011). Neurone zeichnen sich durch ihre hohe Empfindlichkeit gegenüber einer Ischämie aus und stellen daher einen Großteil der avitalen Zellen dar. Darüber hinaus führt die Hypoxie zu einer lokalen Aktivierung von Endothelzellen, Thrombozyten und des Komplementsystems, sodass der Gefäßverschluss verstärkt wird (Iadecola et al., 2011). Durch die Degradierung von Zellen der Blut-Hirn-Schranke kommt es zur Extravasation von Serumkomponenten und Ausbildung eines vasogenen Ödems, das den Blutfluss weiter reduziert (Sandoval et al., 2008; Michinaga et al., 2015).

Geschädigte und sterbende Zellen sowie enzymatisch abgebaute extrazelluläre Matrix setzen sogenannte Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs), wie z. B. Nukleotide und Hitzeschockproteine (engl. Heat Shock Protein, HSP) frei, die zur Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) oder Scavenger-Rezeptoren führen. Die Konsequenz ist die Ausbildung einer sterilen Entzündungsreaktion mit kaskadenartiger Abfolge sich gegenseitig kontrollierender Prozesse. Es resultiert ein Ischämie-Reperfusionstrauma (Morrison et al., 2011). Durch Kopplung der TLR werden zunächst ortsständige Mikrogliazellen, perivaskuläre Makrophagen sowie Endothelzellen aktiviert, wodurch vermehrt proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Iadecola et al., 2011; Jin et al., 2010) gebildet werden. Mastzellen reagieren mit der Freisetzung von Proteasen und vasoaktiven Substanzen wie Histamin. Des Weiteren entsteht eine gesteigerte Expression von Zelladhäsionsmolekülen und Chemokinen. Nach Reperfusion kann dadurch eine verstärkte Einwanderung von Leukozyten beobachtet werden (Kostulas et al., 1998; Yilmaz et al., 2008), wobei als erste Zellen des peripheren Blutes neutrophile Granulozyten in das Infarktgebiet migrieren (Enzmann et al., 2013). Durch sie werden reaktive Sauerstoffspezies, Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und proinflammatorische Zytokine sezerniert, die einerseits die Störung der Blut-Hirn-Schranke vorantreiben und andererseits weitere Entzündungszellen rekrutieren. Zu ihnen gehören überwiegend proinflammatorische Ly6C-hochpositive Monozyten, die zu Makrophagen und myeloiden dendritischen Zellen ausdifferenzieren, die Abräumreaktion kontrollieren sowie mittels Antigenpräsentation über MHC-II-Komplexe die T-Zellantwort regulieren. Sie verdrängen zusammen mit lokalen aktivierten Mikrogliazellen nach drei bis vier Tagen die Neutrophilen (Barone et al., 1995). Ebenso wie aktivierte Mikroglia, können monozytäre Makrophagen einen klassischen entzündungsunterhaltenden M1- oder einen alternativen antiinflammatorischen M2-Phänotyp ausbilden. Während der M1-Typ durch Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies

die Entzündungsreaktion unterhält, mindert der M2-Typ diese aufgrund der Phagozytose von Neutrophilen sowie Zelltrümmern ab und trägt durch Matrixreorganisation zur Reparatur des Gewebes bei (Mantovani et al., 2004; Mosser und Edward, 2008; Yang et al., 2014).

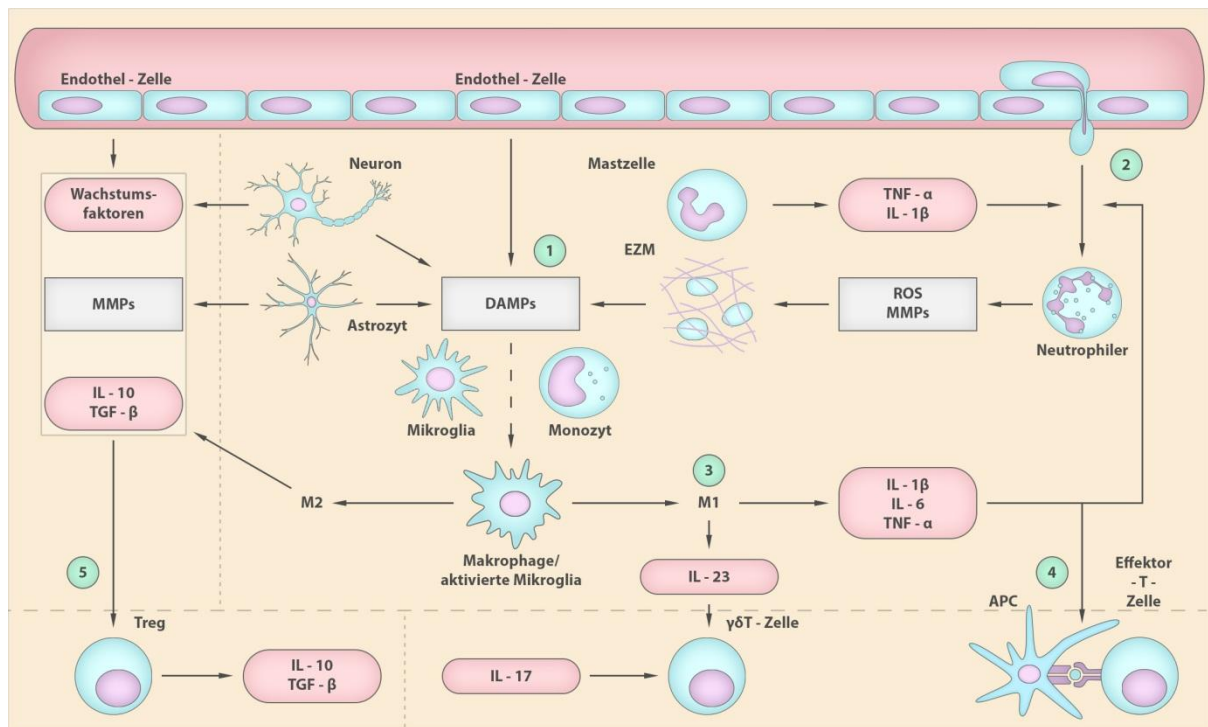


Abbildung 1: Ablauf der lokalen Immunantwort im Schlaganfall. (1) Ischämische Konditionen führen zum Erliegen des Energiehaushalts der Parenchymzellen mit nachfolgender Nekrose und Ausschüttung von DAMPs, Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 sowie Chemokinen. Es resultiert die Aktivierung von residierender Mikroglia und anderen ortsständigen Immunzellen. (2) Gefäßnahe Mastzellen in den Meningen begünstigen die Rekrutierung und Transmigration der ersten Leukozyten, den neutrophilen Granulozyten, welche bereits wenige Stunden nach Infarktbeginn einwandern und ihr Maximum 24 Stunden später erreichen. Sie potenzieren das Anfluten weiterer Immunzellen sowie die Schädigung des Parenchyms durch Proteasen wie MMP-9 und Produktion von ROS, wodurch die Entzündungsreaktion gefördert wird. (3) Sie werden nach wenigen Tagen von einwandernden Monozyten und Makrophagen verdrängt. Mit fortschreitender Zeit kann aktivierte Mikroglia nicht mehr von monozytären Makrophagen unterschieden werden. Der M2-Phänotyp löst den proinflammatorischen M1-Phänotyp ab. Gleichzeitig wird über Makrophagen und (4) dendritische Zellen das adaptive Immunsystem aktiviert und Lymphozyten besiedeln das Infarktgebiet. Neben schädigenden IL-17 produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen und (5) Treg-Zellen in der Frühphase sind CD4-positive dendritische Zellen in der Spätphase detektierbar, welche durch die Ausschüttung von TGF- β und IL-10 ein antiinflammatorisches Milieu schaffen. Weitere Reparaturprozesse werden durch die Verbreitung von Wachstumsfaktoren wie G-CSF und VEGF sowie das Bilden einer astrozytären Glianarbe zur Abschirmung noch gesunden Gewebes erreicht. (links/rechts = anti-/proinflammatorisch, oben/unten = angeborene/adaptive Immunantwort)

Neben Zellen der angeborenen werden in der akuten Phase auch Zellen der adaptiven Immunantwort antigenunabhängig aktiviert. Während regulatorische T-Zellen durch Aufrechterhaltung und Verstärkung des thrombusbedingten Gefäßverschlusses zu einer Mikroziirkulationsstörung führen, beobachtet man durch die Ausschüttung von IL-17 indirekte und Matrix-Metalloproteinasen direkte proinflammatorische

Effekte der $\gamma\delta$ T-Zellen (Shichita et al., 2009; Gelderbloom et al., 2012). Einige Tage nach Infarktbeginn finden sich proinflammatorische CD8-positive zytotoxische T-Zellen und T-Killerzellen sowie CD4-positive dendritische Zellen, die womöglich eine autoimmune Reaktion unterdrücken, in der infarzierten Hemisphäre (Möller et al., 2014). Weiterhin werden schon wenige Stunden nach dem ischämischen Ereignis Astrozyten im Kerngebiet aktiviert. Neben der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, produzieren sie GFAP und demarkieren durch Ausbildung einer Glianarbe das Infarktgebiet, wodurch dieses von vitalen Arealen abgegrenzt wird (Kim et al., 2014). Im weiteren Verlauf werden Reparaturprozesse durch ortsständige Mikrogliazellen initiiert, die IL-10 und TGF- β , sowie Wachstumsfaktoren wie IGF- β ausschütten (Lalancette-Hébert et al., 2007; Kim et al., 2014). Es kommt zur Ausbildung neuer Axone und synaptischer Verbindungen noch vitaler Neurone (Carmichael et al., 2016) sowie zum Einwandern neuronaler Vorläuferzellen (Parent et al., 2003; Ohab et al., 2009).

1.2.3 Bedeutung neutrophiler Granulozyten für die Immunantwort

Die ca. 12 μm bis 15 μm großen, granulären Zellen werden im Knochenmark gebildet und nach einer kurzen Lebenszeit in der Zirkulation (ca. 5 Tage beim Menschen und 12 Stunden in der Maus) von Leber- und Knochenmarksmakrophagen eliminiert. Die Granulopoese, also der Reifungsprozess der Granulozyten im Knochenmark, wird primär durch das Wachstumshormon Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF; siehe 1.3) reguliert. Über die unreifen Stadien Promyelozyt, Myelozyt und Metamyelozyt entwickeln sich stab- und segmentkernige, ausschließlich im Blut befindliche reife Granulozyten. Durch Survivalfaktoren wie G-CSF verlängert sich die Lebensdauer neutrophiler Granulozyten im Gewebe von 1 bis 2 Tage auf 2 bis 4 Tage bevor sie durch ihre eigenen Enzyme untergehen (Simon et al., 2001).

Als Zellen des angeborenen Immunsystems agieren neutrophile Granulozyten in der Frühphase von Entzündungen. Sie migrieren daher als erste Zellen des peripheren Blutes zum Schädigungsort. Ihre Aufgabe liegt in der unspezifischen Eliminierung körperfremder Organismen, vor allem der Abwehr bakterieller Infektionen, durch Phagozytose. Für den Abbau werden präformierte Granula bereit gehalten, die unter anderem die Enzyme Myeloperoxidase, saure Phosphatase, Kollagenase, Gelatinase, MMP-8 und -9, aber auch antimikrobielle Proteine wie Lysozym und Lactoferrin (Bainton et al., 1968; Borregaard et al., 1997; Sternlicht et al., 2001) beinhalten. Degradierete Bestandteile werden über MHC-II-Rezeptoren präsentiert und so Zellen des adaptiven Immunsystems aktiviert.

Infolge des fortlaufenden Erkenntniszugewinns steigt die Evidenz, dass neutrophile Granulozyten auch eine entscheidende Bedeutung für sterile Entzündungsreaktionen besitzen, insbesondere in der Begrenzung des Entzündungsprozesses. Sie koordinierten und steuern den Zustrom weiterer Neutrophiler und anderer Immunzellen. Über die Produktion von Zytokinen und Chemokinen wie IL-8 oder Makrophagen inflammatorisches Protein 1 (MIP-1) werden weitere Immunzellen rekrutiert. Der Abbau und die Prozessierung fremder genauso wie eigener Signalproteine und deren Rezeptoren wirken dem entgegen. Makrophagen und dendritische Zellen phagozytieren apoptotische oder nekrotische Granulozyten (Serhan et al., 2005), die den Prozess durch Ausschüttung von Signalen wie Sphingosin-1-Phosphat unterstützen (Thorp et al., 2011). Ein negativer Feedback wird ausgelöst, wobei weniger IL-23 und infolge auch IL-17 und G-CSF ausgeschüttet werden. Neben der Hemmung der Proliferation und Freisetzung weiterer Granulozyten wird dadurch auch die Rekrutierung anderer Leukozyten minimiert (Stark et al., 2005).

1.2.4 Rolle des neutrophilen Granulozyten im Schlaganfall

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass Neutrophile als erste Leukozyten 30 Minuten bis wenige Stunden nach Ischämie in das geschädigte Gebiet migrieren. Der Neutrophilenpeak liegt dabei 24 Stunden nach dem ischämischen Ereignis (Morrison et al., 2011; Enzmann et al., 2013; Möller et al., 2014). Die gleiche Kinetik konnte auch in anderen sterilen Entzündungsmodellen von Myokardinfarkt, Arteriosklerose, Niereninfarkt, Arthritis und Pneumokoniose nachgewiesen werden (Shen et al., 2013). Nur eine Arbeit zeigte eine maximale Infiltration 48 bis 72 Stunden nach dem Geschehen (Gelderblom et al., 2009), wobei dies gegebenenfalls durch die Wahl eines abweichenden Antikörpers erklärbar ist.

Für das Anlocken neutrophiler Granulozyten zum geschädigten Hirnparenchym werden das primär von Astrozyten produzierte CXCL-1 (murines Homolog für IL-8) (Gelderblom et al., 2012) sowie CXCL-2 und CXCL-8 (IL-8) verantwortlich gemacht (Kostulas et al., 1998; Roy et al., 2012; Wu et al., 2015). Lokal führt die Ausschüttung von Prostaglandinen, Bradikinin, Histamin und NO (Kim et al., 2014) über Vasodilatation zu einer Strömungsverlangsamung, die die hydrodynamische Migration der neutrophilen Granulozyten zur Zellwand begünstigt. Eine zunächst transiente Interaktion (Rolling, engl. Rolling) zwischen Endothel, Leukozyten und Thrombozyten mittels E-, L- und P-Selektinen sowie PSGL-1 wird durch eine intergrinvermittelte Bindung mit granulozytärem CD11a/CD18 (LFA-1) und endothelialelem ICAM-1 (Bindung, engl. Tethering) abgelöst (Russell et al., 2003, Yilmaz et al., 2008). Eine wei-

tere Verstärkung der Endothelanhaftung erfolgt mithilfe von CD11b/CD18 (MAC-1) und ICAM-1 (Kriechen, engl. Crawling) (Phillipson et al., 2006; Wong et al., 2010). An geeigneter Stelle durchwandern Granulozyten schließlich die Zellwand transzellulär bzw. parazellulär. Die Fortbewegung erfolgt entlang eines Chemokingradienten durch Polymerisation und Depolymerisation des Zytoskeletts sowie lokalisierter Volumenänderung durch Ionentransporter, wodurch neutrophile Granulozyten eine längliche Morphologie annehmen (Ehrengruber et al., 1996; Volk et al., 2008). Demnach zeigen stark gefäßadhärente, transmigrierende oder an Gefäßverzweigungen befindliche neutrophile Granulozyten eine stäbchenförmige bzw. sternförmige Gestalt. Im Gegensatz dazu weisen schwach gebundene oder im Gewebe lokalisierte Neutrophile eine runde Form auf (Audoy-Rémus et al., 2008; Roy et al., 2012).

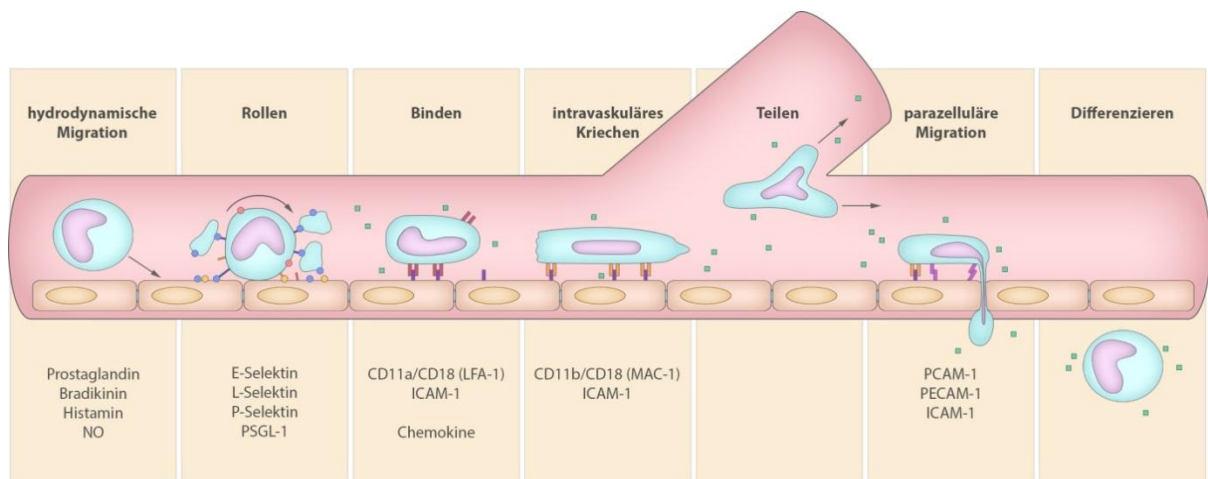


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Granulozytenmigration. Durch Schärstress und vasodilatierende Substanzen werden neutrophile Granulozyten mittels hydrodynamischer Migration in Endothelnähe gedrängt, wo sie eine transiente Interaktion zwischen Selektinen und ihren Liganden eingehen (Rollen). Potenziert wird die Adhäsion durch Thrombozytenaggregation. Eine weitere Verstärkung der Endothelbindung erfährt der Neutrophile durch das Zusammenspiel aus β 2-Integrinen und ICAM-1 (Binden und Kriechen). Hierbei erhält er zur Vergrößerung der Bindungsfläche eine längliche Morphologie. An geeigneter Stelle transmigriert der neutrophile Granulozyt mithilfe von PCAM oder PECAM ins Parenchym wo er erneut eine runde Form annimmt.

Frühe Arbeiten konnten zeigen, dass es durch massive Ansammlung von neutrophilen Granulozyten in den Kapillaren des Infarktgebietes zu mikrovaskulären Okklusionen und dadurch zu einer erneuten Verschlechterung der Reperfusion (engl. No-Reflow) kommt (del Zoppo et al., 1991; Yilmaz and Granger, 2008). Verstärkt wird die Thrombusbildung durch Aktivierung von Thrombozyten mithilfe von Cathepsin G (Nauder et al., 2013) und der extrinsischen Gerinnungskaskade durch Freisetzung von Tissue Factor (TF) (Darbousset et al., 2012). Thrombozyten führen indirekt über Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems zur Verstärkung des Zellödems und sezernieren zudem Zytokine (Müller und Renne et al., 2008). Für das Zusammenspiel von

Thrombozyten und Leukozyten wurde der Begriff der Thromboinflammation geprägt (Nieswandt et al., 2011). Eine erhöhte lokale Ansammlung von neutrophilen Granulozyten verlangsamt den Fluss und fördert die Extravasation. Vor Ort führen sie mit der Ausschüttung von Enzymen wie der Matrix-Metalloproteinase und Neutrophilen Elastase (Gidday et al., 2005; Ikegame et al., 2010) direkt oder durch den Respiratory Burst mit Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies durch NADPH-Oxydase, Myeloperoxydase und NO-Synthetase (Matsuo et al., 1994; Iadecola et al., 1995; Chen et al., 2009) indirekt zur Gewebeschädigung. Nach Kopplung von Thrombozyten an Toll-like-Rezeptoren können neutrophile Granulozyten sogenannte Neutrophil Extracellular Traps (NETs) ausbilden, wobei sich nach Dekondensierung des Chromatins ein netzförmiges Gebilde außerhalb der Zelle formiert, an dem antimikrobielle Proteine, Histone und aus den Granula stammende Proteasen haften (Brinkmann et al., 2007; Papayannopoulos et al., 2010). Neben Schädigung von Umgebungsstrukturen wird durch die Formierung von NETs auch die Thromboinflammation vorangetrieben (Fuchs et al., 2010). Andererseits könnten neutrophile Granulozyten in der Reparaturphase auch einen positiven Einfluss nehmen, da Mikrogliazellen und Makrophagen nach Phagozytose der apoptotischen Granulozyten veranlasst werden, antiinflammatorisch zu agieren und den Prozess der Gewebereparatur zu unterstützen (Cuartero et al., 2013; Serhan et al., 2005).

Weil die schädigenden Eigenschaften überwiegen, bestand die Annahme, dass das Verhindern der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten zu einem reduzierten Infarkt volumen und zu einem besseren Outcome führe. Präklinische Studien in Kleintiermodellen versprachen eine gute Wirksamkeit diverser Ansätze, die vor allen Dingen die Unterbrechung der Granulozyten-Endothel-Interaktion zum Ziel hatten. Doch weder Studien zum vielversprechenden monoklonalen Antikörper gegen ICAM-1, Enlimumab, noch solche, welche auf das β 2-Integrin CD18 zielten, konnten einen signifikanten Unterschied zwischen Placebo- und Verum-Gruppe darstellen (Schneider et al., 1998; Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators, 2001; del Zoppo et al., 2010). Womöglich wurden immunologische Prozesse initiiert, die aufgrund der Komplexität der inflammatorischen Reaktion nach einem Schlaganfall noch nicht verstanden werden.

1.3 Der Granulozyten Kolonie-stimulierende Faktor

1.3.1 G-CSF im Schlaganfall

Da der G-CSF-Rezeptor auch auf Neuronen und Endothelzellen exprimiert wird und folglich einen Einfluss auf diese Zellen haben muss, wurde G-CSF erstmals vor ca. 10 Jahren als therapeutisches Target im experimentellen Schlaganfall untersucht (Six et al., 2003). Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Arbeiten veröffentlicht (siehe Review England et al., 2009; Minnerup et al., 2008), die bis auf wenige Ausnahmen eine signifikante Reduktion des Infarktolumens und eine Verbesserung der neurologischen Funktionen unter G-CSF zeigten. Als Mechanismen wurden eine verbesserte Geweberegeneration durch G-CSF-mobilisierte Stammzellen sowie direkte neuroprotektive Effekte vermutet, da G-CSF die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann.

In In-vitro-Kulturen an Körnerzellen aus dem Kleinhirn wurden erstmals die antiapoptotischen Eigenschaften von G-CSF nachgewiesen (Schäbitz et al., 2003). Weitere experimentelle Schlaganfallstudien konnten demonstrieren, dass verschiedene unabhängige Signalkaskaden nebeneinander ablaufen. Neben der Aktivierung von JAK2/STAT3 zur Transkription von Wachstumsfaktoren und Zytokinen werden ERK 1/2/5 angesteuert und durch Erhöhung von cIAP2 die Caspase 3 gehemmt (Schneider et al., 2005; Solaroglu et al., 2009). Ein essentieller Signalweg wirkt über Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) / Proteinkinase B (Akt) durch Glykogen-Synthase-Kinase (GSK-3 β) und Bcl-2 in Neuronen antiapoptotisch (Pap et al., 1998; Schneider et al., 2005; Li et al. 2015). Zudem belegten Ergebnisse weiterer In-vitro-Studien den funktionellen Einfluss von G-CSF auf die Differenzierung adulter neuronaler Vorläuferzellen über die Expression von neuronalen Markern wie β -III-Tubulin und neurosenspezifischer Enolase (Schneider et al., 2005). Nach Ischämie trägt die Aktivierung des G-CSF-Rezeptors zur Proliferation, Differenzierung und zum selektiven Fortbestehen neuronaler Progenitorzellen des subventrikulären Kortex, Bulbus olfactorius und Hippokampus beider Hemisphären bei, wodurch die Neurogenese unterstützt wird (Schneider et al., 2005). In zur Läsion angrenzenden Arealen wie dem Kortex und Striatum wurde zwar auch eine gesteigerte Proliferation aufgezeigt aber ohne dabei signifikant mehr reife Neurone zu generieren (Schneider et al., 2005). Ein weiterer neuroprotektiver Effekt entsteht durch den Ausbau und die Neubildung von Gefäßen im Ischämiegebiet. Zum einen verstärkt G-CSF vorwiegend in leptomeningealen Gefäßen die Arteriogenese durch Ausbildung von kollateralen Arterien aus präformierten Kapillaren. Zum anderen wird das Aussprossen neuer Gefäße

über die Angiogenese angeregt. Dabei zeigte ein früher Therapiebeginn an Tag 1 eine höhere Endothelproliferation verglichen mit einem Beginn an Tag 7 (Lee et al., 2005). Unterstützt werden die Prozesse durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren migrierender monozytärer Makrophagen (Sugiyama et al., 2011; Duelsner et al., 2012). Eine weitere mögliche Wirkungsweise ist die Ausschüttung von VEGF durch zirkulierende Neutrophile (Ohki et al., 2005).

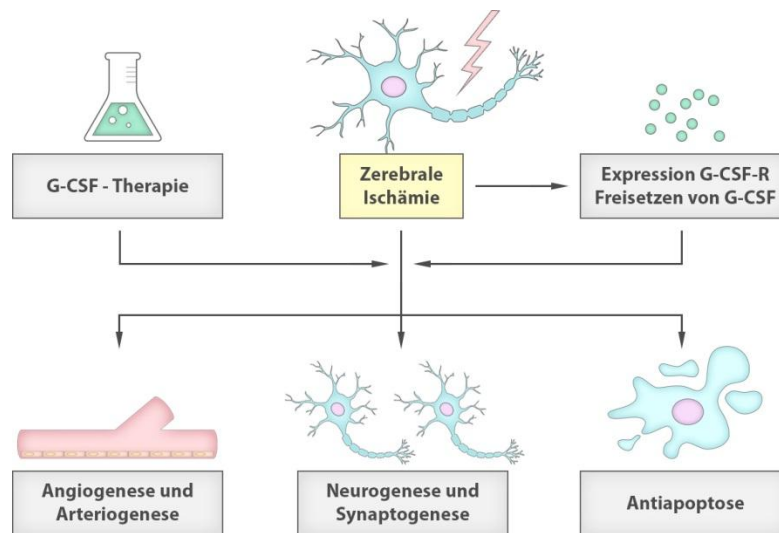


Abbildung 3: Nichtimmunologische Effekte von G-CSF. Aufgrund der verbreiteten Expression des G-CSF-Rezeptors werden auch zahlreiche nichtimmunologische Prozesse durch G-CSF beeinflusst. Nach endogener Ausschüttung bei Ischämie oder durch iatrogene Zufuhr von G-CSF kommt es zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs wodurch nicht nur die Apoptose geschädigter Zellen gehemmt, sondern die Angio- und Arteriogenese angeregt wird. Ein weiterer Mechanismus ist die Unterstützung der Aussprossung von Axonen genauso wie der Neuro- und Synaptogenese unter anderem über das Einwandern neuronaler Progenitorzellen.

Obwohl die primäre Wirkung von G-CSF auf Immunzellen hinreichend bekannt ist, gibt es bisher kaum Arbeiten, die den Einfluss von G-CSF auf die postischämische Entzündungsreaktion untersuchen. In der Studie von Taguchi et al. konnte unter G-CSF eine Zunahme von infiltrierenden myeloiden Zellen im Infarktgebiet nachgewiesen werden, die eine kortikale Atrophie und ein schlechteres klinisches Outcome zur Vergleichsgruppe nach sich zog (Taguchi et al., 2007). Andererseits ließ sich feststellen, dass G-CSF zu einer verminderten Migration von dendritischen Zellen führt, die zudem durch herabgesetzte Aktivierung und Reifung eine fehlende Immunkompetenz aufweisen (Dietel et al., 2012). Überdies supprimiert G-CSF die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α durch Neurone, Astrozyten und aktivierte Mikroglia (Gibson et al., 2005; Solaroglu et al., 2009). Hinzu kommt die Expression von Matrix-Metalloproteinase 9 und iNOS gehemmt, welche direkt oder indirekt durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies Blut-

Hirn-Schranken-Verluste, Ödembildung und Zelluntergang bedingen (Gidday et al., 2005; Sehara et al., 2007).

1.3.2 Einführung

Der Granulozyten Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) ist ein 19,6 kDa großes Glykoprotein, das aus 174 Aminosäuren besteht. Er gehört zu einer Gruppe von Wachstumsfaktoren, die trotz geringer Sequenzübereinstimmung eine ähnliche Struktur aufweisen (Hill et al., 1993) und die Reifung von Blutzellen regulieren. Als primärer Wirkmechanismus stimuliert er die Proliferation multipotenter myeloider Progenitorzellen sowie die Differenzierung granulozytärer Vorläuferzellen und deren Freisetzung aus dem Knochenmark (Christopher et al., 2007). Aufgrund seiner stammzellmobilisierenden Wirkung ist rekombinantes G-CSF (Fingrastin/Lenograstin) für die Therapie der Neutropenie nach Chemotherapie und zur Stammzellgewinnung nach Knochenmarksdepletion zugelassen (Levesque et al., 2008; Hölig et al., 2009). Während Entzündungsreaktionen wird G-CSF vor allem von Immunzellen, mesothelialen Zellen und Endothelzellen produziert. Seine Wirkung beruht auf der Interaktion mit seinem hochaffinen Rezeptor, der nicht nur auf neutrophilen Granulozyten und deren Vorläuferzellen, sondern auch auf Neuronen, Monozyten, Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert wird (Schneider et al., 2005). Kommt es zur Bindung von G-CSF an den G-CSF-Rezeptor, so werden intrazellulär über die Aktivierung von Kinasen und Transkriptionsfaktoren Signalkaskaden ausgelöst, die das Überleben, Proliferieren und Differenzieren der Zielzelle ermöglichen (Schneider et al., 2005). Neben der gesteigerten Neutrophilenproliferation und -reifung trägt die verminderte Expression des von Stromazellen stammenden Faktors 1 (SDF-1, IL-12) und seines Rezeptors CXCR-4, die die Freisetzung von Granulozyten aus dem Knochenmark und ihr Homing regulieren, zur Neutrophilie unter G-CSF bei (Christopher et al., 2007; Levesque et al., 2009). Über die Hemmung der Cysteinprotease Calpain verzögert G-CSF *in vitro* die Apoptose von Granulozyten, sodass diese bis zu 12 Stunden länger überleben (van Raam et al., 2008). Weiterhin erhöht G-CSF die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an ICAM-1 über CD11b/CD18 (MAC-1) und CD11a/CD18 (LFA-1) (Chakraborty et al., 2003). Hinzukommend werden Effekte auf die Phagozytosekapazität, Granulazusammensetzung, Produktion von ROS und den Respiratory Burst beschrieben, die zu einer verbesserten Funktion führen (Demetri et al., 1991; Carulli et al., 1995; Kaushansky et al., 2006). Gleichmaßen wird die Ausbildung von NETs stimuliert (Schoergenhofer et al., 2017), die Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α und IL-8 aber vermindert (Fukuzono et al., 2010).

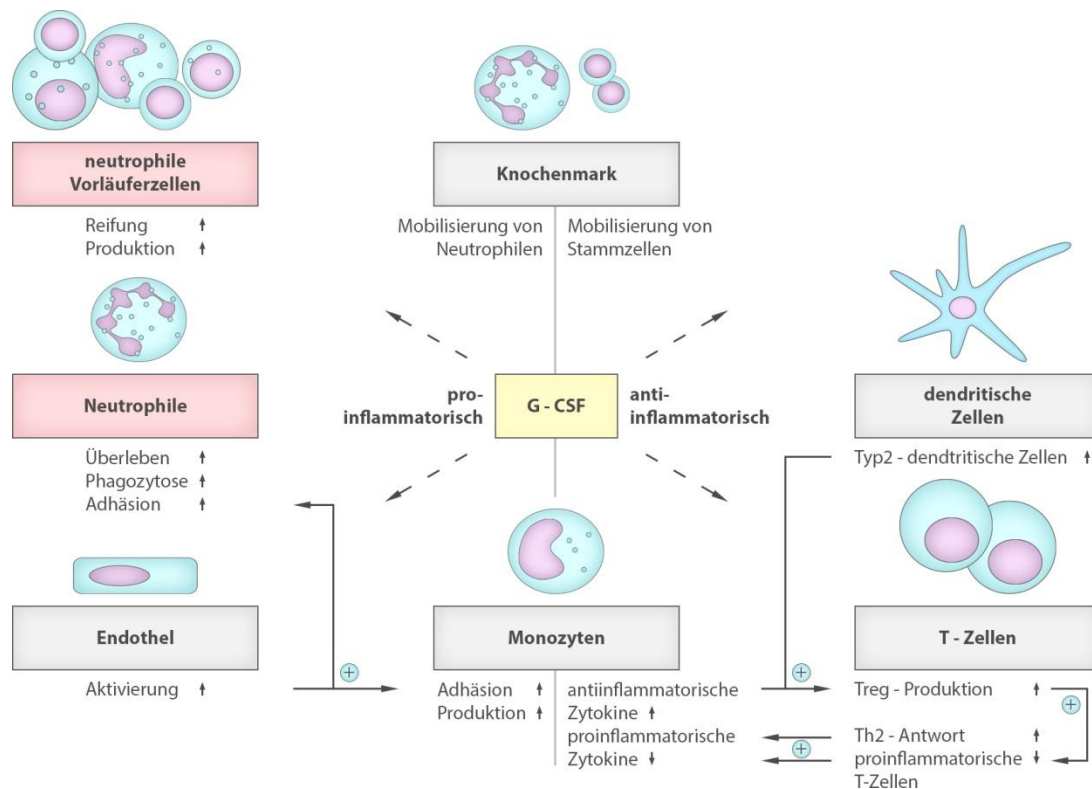


Abbildung 4: Immunologische Effekte von G-CSF. Die Abbildung fasst die immunmodulatorischen Eigenschaften von G-CSF zusammen. Seine hauptsächliche Aufgabe ist die gesteigerte Proliferation neutrophiler Vorläuferzellen und das verlängerte Überleben sowie die verbesserte Funktionalität neutrophiler Granulozyten. Zusätzlich führt er zur Mobilisierung von Neutrophilen und Stammzellen aus dem Knochenmark und regt die Produktion und Adhäsion von Monozyten an. Auf der anderen Seite hemmt er die Bildung von T-Zellen und proinflammatorischen Zytokinen, führt zu einer Verschiebung Richtung Th2-Antwort mit verminderter Aktivierung von Monozyten und Makrophagen und unterstützt die Immuntoleranz durch vermehrte Produktion von regulatorischen T-Zellen, Mobilisation von Typ2-dendritischen Zellen sowie gesteigerter Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen.

Mittlerweile ist klar, dass G-CSF, über die Wirkung auf neutrophile Granulozyten hinaus, das Immunsystem in vielfältiger Weise moduliert. Während nach G-CSF-Administration zwar eine Monozytose detektiert werden kann, wird im Gegenzug die monozytäre Sekretion von $\text{TNF-}\alpha$, IL-12 und IL-1 β gedämpft, wodurch eine antiinflammatorische Wirkung auf T-Zellen erzielt wird. MCP-1 und IL-10 hingegen steigen an (Boneberg et al., 2000; Saito et al., 2002). Infolge wurde die IL-10-abhängige Mobilisation von Typ2-dendritischen Zellen beobachtet, die wiederum die Expression von IL-4 und IL-10 in T-Lymphozyten initiieren und somit eine Th2-Antwort unterstützen (Arpinati et al., 2000; Rutella et al., 2004). Durch die Ausdifferenzierung von T-Helferzellen zugunsten des Th2-Phänotyps werden im peripheren Blut erniedrigte Spiegel von IFN- γ und IL-2 detektiert (Pan et al., 1995), sodass die Proliferation von Effektor-T-Zellen gehemmt und ebenfalls weniger proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden (Franzke et al., 2006). Dies wird zusätzlich durch verstärkte Produktion von regulatorischen T-Zellen und Bildung einer Subpopulation von den-

dritischen Zellen, welche regulatorische T-Zellen aktivieren, unterstützt (Rutella et al., 2007).

1.3.3 Präklinische Schlaganfallstudien mit G-CSF

In den zahlreichen präklinischen Therapiestudien mit G-CSF im Schlaganfall zeigte sich eine durchschnittliche Reduktion des Infarktvolumens um 42 % sowie eine signifikante Verbesserung der sensomotorischen Ausfälle von 24 % bis 40 % (Minnerup et al., 2009). G-CSF wurde weltweit in verschiedenen randomisierten, kontrollierten, verblindeten experimentellen transienten und permanenten Schlaganfallmodellen eingesetzt. Zur Anwendung kamen unter anderem das Filamentmodell und die photothrobotische Ischämieinduktion in Tierspezies wie der Ratte und der Maus (Lanfranconi et al., 2011). Auch Studien mit Ratten, die unter klassischen Komorbiditäten wie arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus litten oder ein höheres Alter aufwiesen (Zhao et al., 2007; Lan et al., 2008; Popa-Wagner et al., 2010), bestätigten die o. g. Ergebnisse. Hinsichtlich des funktionellen Outcomes konnten Kurzzeit- und Langzeiteffekte gemessen werden. Besonders erfreulich ist die nachweisliche Effektivität von G-CSF auch nach dem sonst üblichen kurzen Zeitfenster anderer Schlaganfalltherapeutika. Selbst 24 Stunden nach Ischämiebeginn und sogar im Intervall war die Applikation von G-CSF erfolgreich (Minnerup et al., 2008; England et al., 2009). Die meisten präklinischen Studien, die mit Mäusen und Ratten durchgeführt wurden, arbeiteten mit einer Dosis von 50 µg/kgKG bis 60 µg/kgKG. Aber auch Studien mit 10 µg/kgKG und deutlich höheren Dosen von 300 µg/kgKG wurden umgesetzt (Lanfranconi et al., 2011).

1.3.4 klinische Schlaganfallstudien mit G-CSF

Aufgrund der robusten präklinischen Datenlage wurden einige klinische Studien durchgeführt, die sich mit der Wirkung von G-CSF im menschlichen Schlaganfall beschäftigen (Bath et al., 2013; England et al., 2015). Die größten und bekanntesten sind die prospektiven, doppelblinden und randomisierten kontrollierten Studien AXIS und AX200. Um die Frage nach der Sicherheit und geeigneten Dosis von G-CSF zu klären, wurde die Phase-IIa-Studie AXIS mit 44 Patienten durchgeführt. Eingeschlossen wurden Patienten zwischen 18 und 85 Jahren mit einem Infarkt der mittleren Hirnarterie (NIHSS 4-22 Punkte), dessen Symptome nicht länger als 12 Stunden bestanden. Klinische (modified Ranking Scale (mRS), NIHSS, Barthel-Index), bildmorphologische (MRT-Aufnahmen inklusive DWI) und laborchemische Parameter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bis maximal 90 Tage nach dem Hirninfarkt

aufgezeichnet. Es kam zwar zu einer Leukozytose durch neutrophile Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten innerhalb der ersten 3 Tage nach Therapiebeginn, doch sowohl die Sicherheit, als auch die Infarktgröße blieben ohne nennenswerten Einfluss. Es konnten keine vermehrten thrombembolischen Ereignisse in den Verum-Gruppen detektiert werden und die Anwendung von G-CSF war sogar noch in hohen Dosen (180 µg/kgKG) verträglich. Mitursächlich dafür könnte der antiinflammatorische Effekt durch den signifikanten Abfall des IFN-γ-Spiegels sowie die tendenziell verminderten Spiegel von IL-12 und TNF-α darstellen. Trotz fehlenden Einflusses auf die klinische Verbesserung und das generelle Infarktwachstum bei geringer Fallzahl war der Umstand, dass Patienten mit einem initial größeren Diffusionsdefizit und kortikalem Infarkt offensichtlich von der G-CSF-Therapie profitierten (Schäbitz et al., 2010), als positiv zu bewerten. Daher wurde die multizentrische Phase-IIb-Studie AX200 als Effektivitätsstudie angeschlossen. Da eine gute Sicherheit bewiesen wurde, aber die höchste Dosis keinen Zugewinn der Wirksamkeit erbrachte, entschied man sich für die zweithöchste Dosis von 135 µg/kgKG G-CSF, welches nach initialem Bolus über 72 Stunden intravenös verabreicht wurde. Eingeschlossen wurden 328 Patienten mit einem Mediainfarkt größer als 15 ml in der DWI und Therapiebeginn innerhalb von neun Stunden nach Symptombeginn. Wie in der AXIS-Studie wurden klinische, laborchemische und bildmorphologische Daten verglichen. Doch weder der primäre (mRS) noch der sekundäre Endpunkt (NIHSS) mit einem Unterschied der G-CSF- und Placebogruppe nach 90 Tagen wurden erreicht. In der G-CSF-Gruppe konnten im initialen MRT bei Aufnahme sogar größere Infarktvolumina gemessen werden. Die Endausdehnung blieb allerdings in beiden Gruppen ohne signifikanten Größenunterschied, sodass G-CSF vermutlich einen Einfluss auf das Infarktwachstum hatte. Es ließen sich, wie auch in anderen Studien, erwartungsgemäß gesteigerte Leukozytenzahlen mit vermehrtem Auftreten von Neutrophilen und Monozyten aufzeichnen. Weiterhin wurde ein signifikant niedrigeres Level von IL-1 gemessen. Entgegen bisheriger Ergebnisse konnte zudem ein Einfluss auf Kreislaufparameter mit einem Anstieg der Temperatur und Herzfrequenz bei Abfall des arteriellen Mitteldrucks sowie Elektrolyte mit Hypokaliämie festgestellt werden. Als Erklärungsansätze für das Scheitern der Studie nannten die Autoren die mögliche Verfälschung des Effekts von G-CSF durch die gleichzeitige Gabe von rt-PA, die große Zahl an teilnehmenden Zentren und der mit neun Stunden zu großzügig gefasste Zeitraum des Therapiebeginns, obwohl jeweilige Subgruppenanalysen dies nicht bestätigen konnten. Weiterhin wird angeführt, dass die gewählte Dosis von 135 µg/kgKG, trotz gegenteiliger Ergebnisse in der AXIS-Studie, zu niedrig war und dass eine längere Therapiedauer gegebenenfalls erfolgreicher gewesen wäre. Zu-

dem werden die erstmals detektierten Veränderungen der physiologischen Parameter als möglicher Grund für den ausbleibenden Erfolg diskutiert.

Weitere randomisierte, placebokontrollierte Studien brachten maßgeblich kleinere Fallzahlen auf und zeigten erhebliche Unterschiede im Studiendesign, so z. B. in der Wahl der Dosis, des Therapie- oder des Untersuchungszeitpunktes. In der Zusammenschau wurde die G-CSF-Therapie zwar als gut tolerabel und sicher eingestuft, es konnte jedoch keine signifikante Änderung hinsichtlich des funktionellen Outcomes oder Todes verzeichnet werden bei signifikant erhöhten Leukozytenzahlen (Sprigg et al., 2006; Shyu et al., 2006; Lanfranchi et al., 2011; Bath et al., 2013).

1.4 Dosistranslation von experimentellen zu klinischen Studien

Letztendlich zeigten klinische Studien ernüchternde Ergebnisse nach vielversprechender robuster präklinischer Datenlage. Eine mögliche Erklärung könnte der negative Einfluss der verstärkten Leukozyten- und Neutrophilenmobilisation auf die postischämische Entzündungsreaktion sein, wie o. g. Daten vermuten lassen. Trotz des Nachweises umfangreicher immunologischer Wirkungen von G-CSF in präklinischen Studien wurde der Einfluss auf die postischämische Inflammation im Gehirn kaum untersucht. Umso überraschender ist der Einsatz vielfach höherer Dosen von G-CSF in klinischen Studien als in den erfolgreichen präklinischen Arbeiten. Um die Dosis von einer Spezies auf andere übertragen zu können, müssen Korrekturfaktoren wie Blutvolumen, Zirkulationszeit, zirkulierende Plasmaproteine, Clearance, Sauerstoffverbrauch, kalorische Ausgaben und der basale Metabolismus beachtet werden, wobei dies als Allometrie bezeichnet wird (Blanchard et al., 2015). Eine Möglichkeit zur allometrischen Berechnung der humanen Äquivalenzdosis (engl. Human Equivalent Dose, HED) unter Einbezug der Körperoberfläche (engl. Body Surface, BSA) bietet Reagan-Shaw, welche als Grundlage vieler klinischer Studien diente (Blanchard et al., 2015), da sie auf zahlreiche Säugetiere angewendet werden kann (Reagan-Shaw et al., 2008). Übersetzt man anhand dieser Formel die in der AX200-Studie und den präklinischen Studien verwendeten Dosierungen, fällt eine gewaltige Diskrepanz zwischen den murinen und humanen Dosen auf. Während in den erfolgreichen präklinischen Studien überwiegend mit 50 µg/kgKG gearbeitet wurde, fand in der klinischen Studie AX200 mit 135 µg/kgKG eine mehr als zehnfache murine Dosis von G-CSF Anwendung, die nach Umrechnung eine kumulative Gesamtdosis über drei Tage von 1665 µg/kgKG für Mäuse bedeuten würde.

2 Zielstellung der Arbeit

Aus den obigen Ausführungen ergibt sich die Frage, inwieweit sich immunologische Einflüsse, insbesondere die verstärkte Neutrophilenmobilisation durch G-CSF, negativ auf die Entzündungsreaktion im Schlaganfallgeschädigten Gehirn ausgewirkt haben und somit für die gescheiterte Translation der vielversprechenden präklinischen Daten verantwortlich sind. Dies gilt umso mehr, als dass in der AX200-Studie eine mehr als zehnfach höhere Dosis eingesetzt wurde als in der Mehrheit der präklinischen Studien. Für die Reduktion der Infarktgröße und funktionellen Erholung ließ sich eine Dosisabhängigkeit aufzeigen (Minnerup et al., 2008). Für immunologische Parameter wurden dafür bisher nur wenige Nachweise geführt. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von G-CSF in der üblicherweise präklinisch eingesetzten Dosierung von 50 µg/kgKG sowie der murinen Äquivalenzdosis der AX200-Studie auf die frühe Entzündungsreaktion nach einem Schlaganfall zu untersuchen. Als Vergleich dienten eine Schlaganfallgruppe ohne G-CSF-Therapie, eine Scheinschlaganfallgruppe sowie naive Mäuse. Zum Analysezeitpunkt 24 Stunden nach Ischämie war der Peak der Neutrophileninfiltration zu erwarten. Mittels der Filamentmethode wurde ein ischämischer Schlaganfall im Mausmodell ausgelöst und das Hirninfiltrat durchflusszytometrisch analysiert. Aufwendige histologische Untersuchungen erlaubten ergänzende Aussagen zur Morphologie und räumlichen Verteilung der neutrophilen Granulozyten. Darüber hinaus wurden die Immunzellpopulationen im Blut untersucht, um Aufschlüsse über periphere beziehungsweise systemische Effekte unterschiedlicher Dosierungen von G-CSF zu erhalten.

Aus dieser Zielstellung ergaben sich folgende Fragen:

1. Führt G-CSF in niedriger und/oder hoher Dosierung zu einer verstärkten Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Schlaganfallgeschädigte Gehirn?
2. Nimmt G-CSF (dosisabhängig) weitere Einflüsse auf die Zusammensetzung des frühen entzündlichen Infiltrats im Gehirn?
3. Verändert G-CSF neben möglichen quantitativen Effekten auch die räumliche Verteilung bzw. die Zellmorphologie einwandernder neutrophiler Granulozyten?
4. Unterscheiden sich periphere immunologische Wirkungen des G-CSF (dosisabhängig) nach Schlaganfall?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Versuchstiere waren 10 bis 14 Wochen alte männliche Mäuse des Inzuchtstamms C57BL/6 mit einem Körpergewicht von 25 g bis 30 g, die von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Die Haltung der Mäuse erfolgte artgerecht und schonend im institutseigenen Tierstall mit freiem Zugang zu Futter und Wasser. Ein Tag-Nachtrhythmus von jeweils 12 Stunden wurde eingehalten. Das Versuchsvorhaben wurde durch die Landesdirektion Leipzig unter der Protokollnummer TVV 12/11 genehmigt. Als Grundlage für die Durchführung und Dokumentation der Experimente dienten die ARRIVE-Richtlinien (Kilkenny et al., 2010). Alle experimentellen Prozeduren wurden streng nach den Tierschutzvorgaben des Regierungsbezirks Leipzig durchgeführt.

3.2 Schlaganfallmodell

Der Schlaganfall wurde in dieser Arbeit durch den transienten proximalen Verschluss der mittleren Hirnarterie mithilfe eines Filaments (tMCAO) ausgelöst. Hierbei handelt es sich um das am häufigsten angewandte Modell eines experimentellen Schlaganfalls, das sich durch eine Reproduzierbarkeit von Infarkt volumina und -lokalisation sowie eine variabel wählbare Verschlusszeit auszeichnet (Engel et al., 2011; Canazza et al., 2014). Diese Prozedur wurde bei allen Tieren von Frau Dr. med. G. Weise nach publiziertem Standard „Operating Procedures“ für das tMCAO-Modell durchgeführt (Dirnagl et al., 2009). 30 Minuten vor dem operativen Eingriff wurde den Mäusen zur Analgesie 4 mg/kgKG Carprofen subkutan in die Nackenfalte appliziert.

Für die tMCAO wurde das Versuchstier in eine tiefe Inhalationsnarkose versetzt. Die Körpertemperatur wurde während der Operation mithilfe eines regulierbaren Heizkissens kontinuierlich im Bereich von 37,0 °C bis 37,5 °C gehalten. Über einen mittelliniennahen Hautschnitt am Hals erfolgte die stumpfe Präparation der rechten A. carotis communis bis zur Bifurkation in die äußere und innere Halsschlagader. Nach Ligatur der rechten A. carotis communis und A. carotis externa wurde ein Gefäßclip über der rechten A. carotis interna positioniert. Anschließend wurde die A. carotis communis distal der Ligatur eröffnet und ein dünner silikonbeschichteter Faden in das Gefäß eingeführt, der bis zum Abgang der A. cerebri media vorgeschoben wurde (Abbildung 5 A). Nach 45-minütiger Okklusionszeit wurde der Faden entfernt. Die

Reperfusion der mittleren Hirnarterie war durch eine prompte Blutung aus der Inzision der A. carotis communis zu erkennen. Sie ist auf eine Kollateralisierung über den Circulus Willisii zurückzuführen. Unmittelbar nach dem Fadenzug musste die A. carotis communis daher distal des eröffneten Gefäßes verschlossen werden. Im Anschluss erfolgte die Hautnaht mit resorbierbarem Faden in Rückstichtechnik. Zur Volumensubstitution erhielt das Versuchstier ein subkutanes Depot körperwarmer isotoner Kochsalzlösung (1 ml pro Maus).

Abbildung 5 B zeigt einen exemplarischen Hirninfarkt der rechten Hemisphäre. Der Infarktkern liegt bei diesem Modell im Bereich der Basalganglien, die bereits nach 30-minütiger Verschlusszeit infarziert sind. Bei 45-minütiger Verschlusszeit, wie in dieser Arbeit, dehnt sich der Infarkt auf den angrenzenden parietotemporalen, und in geringem Maß auch okzipitalen Kortex aus.

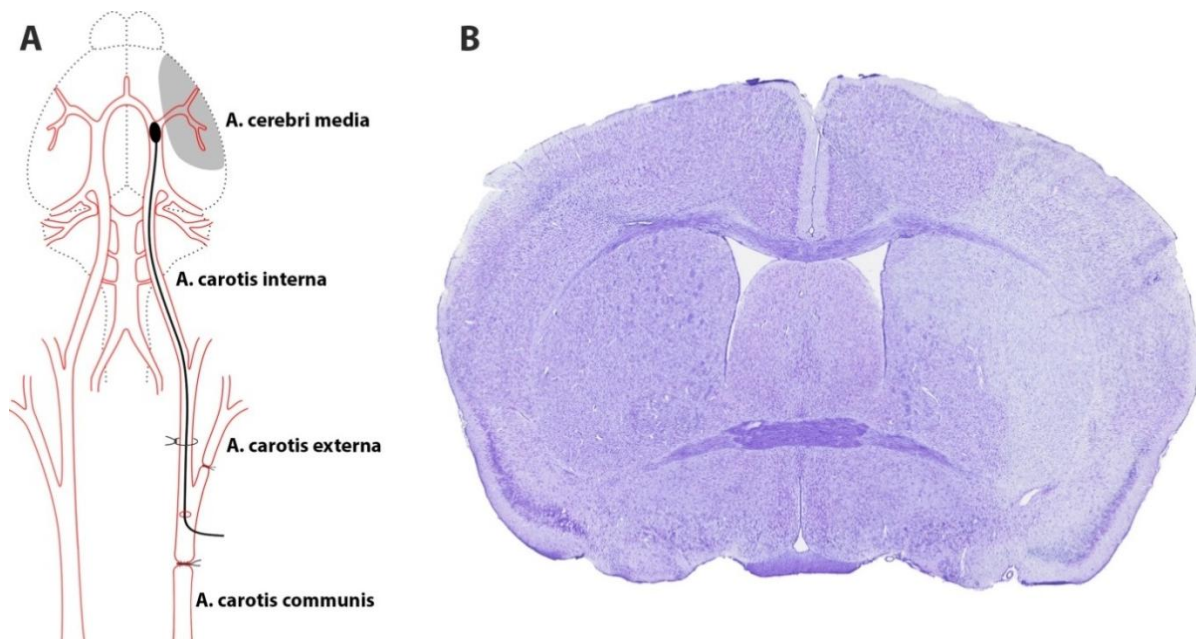


Abbildung 5: Transient Middle Cerebral Artery Occlusion (tMCAO) mit resultierendem Infarktgebiet. (A) Beim transienten Verschluss der mittleren Hirnarterie wird nach Ligatur der proximalen A. carotis communis und der A. carotis externa sowie vorübergehendem Clipping der A. carotis interna die A. carotis communis distal der Ligatur eröffnet und ein Silikonfaden eingeführt, der bis zum Abgang der A. cerebri media vorgeschoben wird. Dieser wird nach 45-minütiger Verschlusszeit wieder entfernt (Beispiel für linke A. cerebri media). (B) Es resultiert ein Infarktgebiet im Bereich der Stammganglien (Infarktkern), das sich auf Anteile des parietalen, temporalen und geringer auch okzipitalen Kortex ausdehnt, wie in dem repräsentativen Koronarschnitt eines Maushirns mit rechtshemisphäriellem Infarkt (Nissl) zu erkennen ist.

3.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Folgende Ausschlusskriterien wurden definiert: I) Operationszeit > 15 Minuten II) fehlende Reperfusion nach Fadenzug III) OP-Komplikationen, wie Verletzung des N.

vagus oder exzessive Blutungen. Von der Auswertung wurden 8 Tiere von insgesamt 65 Tieren ausgeschlossen (n = 1 Scheinschlaganfall, n = 3 MCAO, n = 3 G-CSF ND, n = 1 G-CSF HD). Ein Versuchstier konnte nicht in die Auswertung einbezogen werden, da Probleme bei der Probenaufarbeitung auftraten. Alle Mäuse überlebten die ersten 24 Stunden nach Operation.

3.4 Versuchsplan

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob und inwieweit der Wachstumsfaktor G-CSF dosisabhängig die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Gehirn nach einem experimentellen Schlaganfall verändert. Zu diesem Zweck wurde das Gehirn von C57BL/6-Mäusen 24 Stunden nach Induktion eines Schlaganfalls bzw. nach Scheinoperation mittels Durchflusszytometrie (Quantifizierung) und Immunhistochemie (Quantifizierung mittels manueller Zählung und Bestimmung der räumlichen Verteilung) untersucht. Die Auswertungen am ischämischen Gehirn wurden durch eine durchflusszytometrische Analyse des peripheren Blutes ergänzt, um mögliche periphere Immuneffekte durch die G-CSF-Behandlung zu detektieren. Daneben wurden mit prozentualer Gewichtsabnahme und absolutem Milzgewicht physiologische Daten der Tiere erhoben. Neurologische Endpunkte wie das Infarktvolu-men und der funktionelle Outcome nach 24 Stunden waren nicht Teil dieser Arbeit.



Abbildung 6: Versuchsablauf. Die Abbildung veranschaulicht den zeitlichen Ablauf des Versuchs. Den Experimentalgruppen wurde entweder 5%ige Glukoselösung (GLC) oder G-CSF in niedriger (GCSF ND) beziehungsweise hoher (GCSF HD) Dosierung unmittelbar nach der Operation (OP) und 12 Stunden später intraperitoneal verabreicht. Nach 24 Stunden wurden die Tiere euthanasiert (E) und Durchflusszytometrie (FACS) sowie Immunhistochemie (IHC) als Endpunktanalysen durchgeführt. Zusätzlich wurde das Körpergewicht (vor und 24 Stunden nach Schlaganfall) und Milzgewicht bestimmt.

Insgesamt wurden fünf Experimentalgruppen gebildet und in einer Blindstudie untersucht. Dabei wurde den Versuchstieren nach Auslösung eines Schlaganfalls der

Wachstumsfaktor G-CSF entweder in einer niedrigen (Niedrigdosis, GCSF ND) oder hohen Dosis (Hochdosis, GCSF HD) verabreicht. Tieren der Versuchsgruppe MCAO wurde nur die Trägerlösung appliziert (MCAO). Als Kontrollgruppe für den Schlaganfall dienten scheinoperierte Mäuse (Schein). Naive Mäuse (Naiv), die keiner operativen Prozedur unterzogen wurden, wurden ergänzt, um einen Ausgangswert ohne Manipulation erheben zu können.

Versuchsgruppe	Anzahl IHC	FACS-Blut	FACS-Hirn
GCSF HD	3	6	6
GCSF ND	3	6	6*
MCAO	3	5	7
Scheinschlaganfall	-	3	4
Naiv	-	3	3

Tabelle 1: Übersicht der Experimentalgruppe. Die Tabelle zeigt die Anzahl der Tiere, welche pro Experimentalgruppe für die Durchflusszytometrie beziehungsweise Immunhistochemie genutzt wurden. * kennzeichnet einen Ausschluss durch Prozessierungsfehler.

3.5 Behandlung mit G-CSF

In der vorliegenden Arbeit wurde das kommerziell erhältliche G-CSF-Humanpräparat Neupogen (Amgen GmbH, München) verwendet. Die Dosierung für die Niedrigdosisgruppe wurde den erfolgreichen präklinischen Vorgängerstudien entlehnt, die sich mit den neuroprotektiven und -regenerativen Eigenschaften von G-CSF im Schlaganfall beschäftigten (England et al., 2009; Lanfranconi et al., 2011). In der Niedrigdosisgruppe wurden daher 50 µg/kgKG unmittelbar nach Auslösung des experimentellen Schlaganfalls intraperitoneal verabreicht. Für die Hochdosisgruppe wurde die in der AX200-Studie (Ringelstein et al., 2013) innerhalb der ersten 24 Stunden eingesetzte humane Dosis von 67,5 µg/kgKG mittels folgender, auf die Körperoberfläche normalisierter Formel nach Reagan-Shaw (Reagan-Shaw et al., 2008) auf den Mausorganismus umgerechnet.

$$\text{HED} \left(\frac{mg}{kgKG} \right) = \text{Tierdosis} \left(\frac{mg}{kgKG} \right) \cdot \frac{\text{Km murin}}{\text{Km human}} \quad (1)$$

$$\text{Tierdosis} \left(\frac{mg}{kgKG} \right) = \text{HED} \left(\frac{mg}{kgKG} \right) \cdot \frac{\text{Km human}}{\text{Km murin}}$$

$$\text{Tierdosis} \left(\frac{mg}{kgKG} \right) = 0,0675 \frac{mg}{kgKG} \cdot \frac{37}{3}$$

$$\text{Tierdosis} = 0,833 \frac{\text{mg}}{\text{kgKG}} \quad (2)$$

mit HED: humane Äquivalenzdosis (engl. Human Equivalent Dose)

Km murin = 3

Km human = 37

Anstelle der kontinuierlichen Gabe, wie in der AX200-Studie, wurden zwei Einzeldosen, und zwar unmittelbar nach der Operation und 12 Stunden später appliziert. In der Niedrigdosisgruppe wurde zum zweiten Injektionszeitpunkt 12 Stunden postoperativ lediglich die Trägersubstanz in Form einer 5 %igen Glukoselösung verabreicht. Die MCAO- sowie Scheinschlaganfallgruppe erhielt zu beiden Applikationszeitpunkten die 5 %ige Glukoselösung. Hierdurch sollte eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den Applikationsvorgang und die Trägersubstanz selbst kontrolliert werden. Naive Versuchstiere erhielten weder den Wachstumsfaktor noch die Trägersubstanz um einen unbeeinflussten Ausgangswert zu erhalten.

3.6 Euthanasie und transkardiale Perfusion

24 Stunden nach dem ischämischen Ereignis wurden die Mäuse gewogen und anschließend in tiefer Inhalationsnarkose mit Isofluran durch CO₂-Exposition euthanasiert. Nach vorsichtiger Eröffnung des Brustkorbes wurden 200 ml Blut aus dem rechten Vorhof für die durchflusszytometrische Analyse entnommen und in Monovetten überführt. Anschließend wurde eine stumpfe Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt, das rechte Herzohr eröffnet und der Kreislauf mit 50 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Durchflusszytometrie) oder 50 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Immunhistochemie) perfundiert. Zusätzlich erhielten Mäuse der immunhistochemischen Analyse 50 ml einer 4 %igen Paraformaldehydinfusion um das zerebrale Gewebe zu fixieren. Im Anschluss erfolgte die Dekapitation der Mäuse auf Höhe des zweiten Halswirbelkörpers. Das Gehirn wurde vorsichtig aus seinen anatomischen Knochenstrukturen freipräpariert und entnommen. Für die durchflusszytometrische Analyse erfolgte die kurzzeitige Lagerung in eisgekühltem HBSS. Danach wurde das Gehirn direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Gehirne der immunhistochemischen Analyse wurden zur weiteren Fixierung 24 Stunden in 4 %iger Paraformaldehydlösung gelagert. Zudem wurde die Milz entnommen und ihr Gewicht unverzüglich mit einer Feinwaage bestimmt.



Abbildung 7: Versuchstier in Transportbox vor Euthanasierung und vor Probenentnahme. Die Euthanasierung und Probenentnahme erfolgte nach standardisiertem Protokoll.

3.7 Quantifizierung der Leukozytenzahl im Vollblut

Zum Schutz vor Koagulation wurde das periphere Blut unmittelbar nach Entnahme in Monovetten überführt, die 2 mmol EDTA-Lösung enthielten. Vor der Prozessierung wurde das absolute Blutvolumen bestimmt und eine durchlichtmikroskopische Quantifizierung der Leukozytenzahl mithilfe einer Neubauerzählkammer vorgenommen. Hierfür wurden die Zellen mit Türck'scher Lösung im Verhältnis 1:10 gefärbt. Der in der Lösung enthaltene Eisessig bedingte eine hypotone Lyse der Erythrozyten, so dass die verbleibenden intakten Zellen Leukozyten darstellten. Es wurde die durchschnittliche Zellzahl aus der Auszählung von jeweils vier Zählquadraten ermittelt und nach unten stehender Formel die Gesamtzellzahl für das entnommene Blutvolumen errechnet.

$$\text{Zellzahl (pro ml Blut)} = \frac{\sum \text{Zellzahl 4 Großquadrate}}{4} \cdot 10^4 \cdot \text{VF} \quad (3)$$

$$\text{Gesamtzellzahl (ml)} = \frac{\sum \text{Zellzahl 4 Großquadrate}}{4} \cdot 10^4 \cdot \text{VF} \cdot V \text{ Blut} \quad (4)$$

mit VF: Verdünnungsfaktor
V Blut: Blutvolumen

3.8 Durchflusszytometrische Aufarbeitung

3.8.1 Lyse- und Färbeprotokoll Blut

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden in einem FACS-Tube 50 µl Vollblut mit 50 µl PBS (ohne Ca/Mg) verdünnt und für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss

wurde das Antikörpergemisch zugegeben, die Probe vorsichtig gemischt und für 20 Minuten im Dunkeln bei 4 °C auf Eis inkubiert. Zur Erythrozytenlyse wurden 2 ml der zuvor im Verhältnis 1:10 in Aqua dest. verdünnten BD-Lysing Solution (BD Biosciences, Heidelberg) der Probe hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation für 10 Minuten in der Dunkelkammer auf Eis wurde das Tube bei 400 x g und 10 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Waschpuffer (PBS + 3 %iges FCS) aufgenommen und abermals bei 350 x g zentrifugiert. Hiernach wurde das Pellet in 0,3 ml PBS aufgenommen und bis zur Analyse bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Pro Blutprobe wurden eine Autofluoreszenzkontrolle (AFKO) und ein Panel analysiert.

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
CD45.2-FITC	Anti-Maus	1:1000	Ebioscience, Frankfurt
NK1.1-PE	Anti-Maus	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
Ly6G-PerCP-Cy5.5	Anti-Maus	1:1000	BD Biosciences, Heidelberg
CD25-PC7	Anti-Maus	1:200	Ebioscience, Frankfurt
CD3-APC	Anti-Maus	1:200	BioLegend, San Diego, USA
CD4 efluor 780-APC-Cy7	Anti-Maus	1:200	Ebioscience, Frankfurt
CD8 efluor 480-PB	Anti-Maus	1:100	Ebioscience, Frankfurt
B220-V500	Anti-Maus	1:50	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 2: Antikörperübersicht peripheres Blut.

3.8.2 Isolation von Immunzellen aus dem Maushirn und Färbeprotokoll

Für das Erstellen einer Einzelzellsuspension wurden die Hirnhälften mit einem Skalpell dreigeteilt und je ein Teil durch ein 100-µm-Zellsieb unter kontinuierlichem Spülen mit 15 ml kaltem HBSS homogenisiert. Die Suspensionen wurden für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Verdauungspuffer (2 U/ml von Liberase TL (Roche, Schweiz) in HBSS mit Ca/Mg) resuspendiert. Der enzymatische Verdau mit Liberase TL erfolgte über 1 Stunde bei 37 °C unter kontinuierlicher Rotation. Nach Zugabe von 3 ml Waschpuffer (HBSS ohne Ca/Mg, mit 10 %igem FCS und 200 U DNase I (Roche, Schweiz)) wurden die Zellsuspensionen, gefolgt von 15 ml DNase-freiem Waschpuffer erneut durch ein Zellsieb (70 µm) gestrichen. Die Proben wurden nun mit 286 x g für 5 Minuten bei 18 °C zentrifugiert. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde das Pellet anschließend in 5 ml 25 %iges Percoll in HBSS mit 3 %iger FCS-Lösung aufgenommen. Nach einer Zentrifugation mit 521 x g bei 18 °C für 20 Minuten ohne Bremse konnte unterhalb des Überstandes der die Durchflusszytometrie störende Myelindebris entfernt werden. Das Pellet wurde erneut in 10 ml Waschpuffer suspendiert und bei 286 x g

und 10 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in 100 µl Waschpuffer aufgenommen. Zellausbeute sowie die Vitalität der Zellen wurden durch Trypanblau-Färbung in einem Hämocytometer untersucht. Für die FACS-Analyse wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen mit einem Anti-Maus-CD16/CD32-Fc-Rezeptorblocker für 10 Minuten bei 4 °C behandelt und anschließend mit dem monoklonalen Anti-Maus-Antikörpergemisch gefärbt. Nach 20 Minuten Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen gewaschen, in 300 µl PBS mit 3 %igem FCS resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Es wurde jeweils eine Autofluoreszenzkontrolle, ein Panel und ein BD TruCount Tube (BD Biosciences, Heidelberg) angefertigt.

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
CD45.2-FITC	Anti-Maus	1:100	Ebioscience, Frankfurt
Ly6G-PerCP-Cy5.5	Anti-Maus	1:1000	BD Biosciences, Heidelberg
CD3-PE	Anti-Maus	1:200	BioLegend, San Diego, USA
CD19-PE-Cy7	Anti-Maus	1:1000	BioLegend, San Diego, USA
F4/80-Alexa Fluor 647-APC	Anti-Maus	1:50	AbD Serotec
Ly6C-APC-Cy7	Anti-Maus	1:200	BD Biosciences, Heidelberg
MHCII-efluor 450-PB	Anti-Maus	1:100	Ebioscience, Frankfurt
CD11b-Horizon V500	Anti-Maus	1:200	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 3: Antikörperübersicht Hirn.

3.9 Durchflusszytometrische Analyse

Bei der durchflusszytometrischen Messung wird eine Einzelzellsuspension aufgrund hydrodynamischer Fokussierung durch einen oder mehrere Laser geführt. Dabei kommt es zu einer Aussendung charakteristischer Lichtsignale, die von Detektoren registriert werden. Mithilfe des sogenannten Tyndall-Effektes kann die Zelle hinsichtlich ihrer relativen Größe, gemessen als Vorwärtsstreulicht (FSC), und ihrer relativen Granularität, gemessen als Seitwärtsstreulicht (SSC), analysiert werden. Zudem ist eine Unterscheidung durch Bindung spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper an Oberflächenproteine möglich. Hier macht man sich die Stokes-Verschiebung zunutze, bei der es nach Anregung eines Fluorochroms zur Aussendung von Licht geringerer Wellenlänge kommt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben durch einen verblindeten Untersucher mit dem 3-Laser-Durchflusszytometer FACSCanto II (BD Biosciences, Heidelberg), das die Unterscheidung von acht Fluorochromen erlaubt, gemessen. Das Durch-

flusszytometer war mit der Software FACSDiva (BD Biosciences, Heidelberg) ausgestattet. Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Daten mit der Software FlowJo Vx (Tree Star, Inc., Ashland, USA).

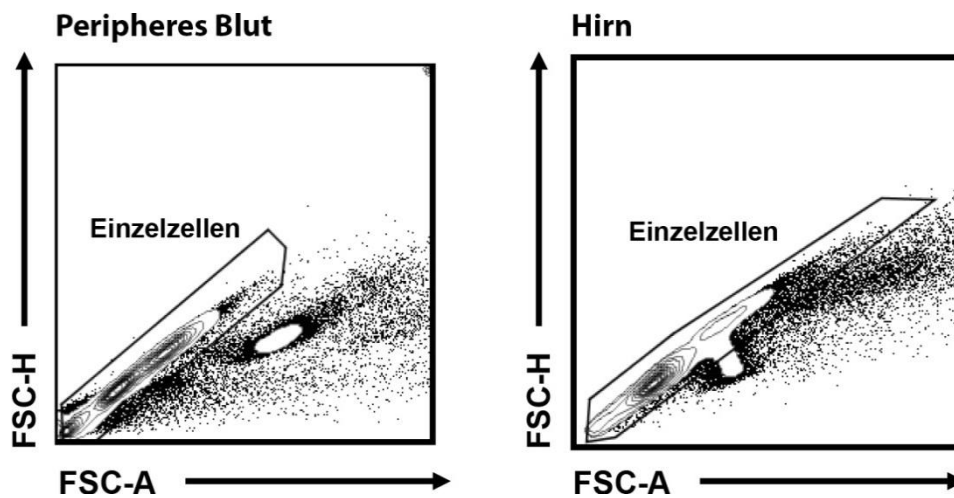


Abbildung 8: Gatingschema für Single Cell Gate. Die Abbildung zeigt die Gatingschemata des Single Cell Gates für peripheres Blut und Hirn.

Zunächst wurden die lebenden Einzelzellen mittels Single Cell Gate (Abbildung 8) und Life Gate ausgewählt. Nachfolgend konnten die Subklassifizierungen anhand der charakteristischen Oberflächenantigene vorgenommen werden (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die absolute Zellzahl der Leukozytensubpopulationen konnte nach Multiplikation der Leukozytenzahl mit dem prozentualen Anteil aus der durchflusszytometrischen Analyse berechnet werden. Für das periphere Blut wurde die absolute Leukozytenzahl, wie oben beschrieben, durch Auszählung in einer Neubauerzählkammer bestimmt (siehe 3.7). Die absolute Zellzahl der hirninfiltrierenden Leukozyten wurde hingegen mithilfe einer zusätzlichen BD TruCount Analyse von CD45-markierten Zellen vorgenommen.

3.10 Histopathologische Aufarbeitung

3.10.1 Anfertigung histologischer Schnitte im Kryostat

Das Hirn wurde mit einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung und anschließender aufsteigender Sucrosereihe mit jeweils 50 ml 10 %iger, 20 %iger und 30 %iger Lösung bis zur Absättigung vorbehandelt. Die anschließende Lagerung der Hirne erfolgte in 30 %iger Sucrose bei 4 °C mit einer Spatelspitze Natrium-Azid auf 500 ml Sucrose. Nach dem Einfrieren im frostgekühlten 2-Methyl-Butan bei -65 °C für 15 Sekunden wurde das Hirn in den 21 °C kalten Kryostaten (Leica CM 3050, Leica

Biosystems, Wetzlar) überführt. Hier musste zur Temperaturangleichung eine Inkubationszeit von 30 Minuten eingehalten werden. Darauffolgend konnte das Hirn mit dem Kryostatschneider im Free-Floating-Verfahren bearbeitet werden. Mittels Kryofixation wurde das Hirngewebe auf die Objektträger zu je drei 20 µm dünnen koronaren Schnitten aufgezogen. Diese wurden bei -20 °C gelagert. Insgesamt wurden zwischen 100 und 150 Objektträger pro Hirn angefertigt.

3.10.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die anatomische Orientierung wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf fünf Objektträgern im Abstand von ca. 600 µm durchgeführt. Der mutmaßliche Infarktbereich wurde dabei ausgespart. Anhand anatomischer Fixpunkte, wie dem Ventrikelsystem, Corpus callosum und der Hippocampi, konnten die ausgewählten Schnitte mit einem Stereotaxie-Atlas des Mausgehirns (Franklin et al., 2007) ihren Bregmabereichen zugeordnet werden. Damit war auch eine genaue Einteilung der zwischen den ausgewählten Objektträgern seriell erstellten Hirnschnitte möglich. Nachdem die Gefrierschnitte bei Raumtemperatur getrocknet waren, wurden sie für 3 bis 5 Minuten in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) belassen. Anschließend erfolgte für eineinhalb Minuten bei Raumtemperatur die Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun. Nach einem kurzen Waschgang in VE-Wasser wurde der Farbstoff für mindestens 10 Minuten unter fließendem lauwarmen Leitungswasser fixiert. Im Anschluss befand sich der Objektträger für eine Minute in einer abgedunkelten Küvette mit 100 %iger Essigsäure versetzter Eosinlösung. Abschließend wurde nach erneutem Waschgang in Leitungswasser eine Entwässerung und Differenzierung in der aufsteigenden Alkoholreihe vorgenommen und die Schnitte mit Entellan/Roti-JHisto-Kit (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

3.10.3 Immunfluoreszenz

Zur immunhistochemischen Färbung der neutrophilen Granulozyten wurde ein Primär-Sekundärantikörper-System verwendet. Hierbei bindet ein Primärantikörper an das Zielantigen und wird durch einen fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht, um eine Amplifikation des Signals zu erreichen. Als Primärantikörper wurde ein aus der Ratte stammender Antikörper gegen das Gr1-Antigen eingesetzt. Das Myeloid-Differenzierungsantigen Gr1 setzt sich aus den Komponenten Ly6C und Ly6G zusammen (Rose et al., 2012). Es wird in der Literatur als Marker für neutrophile Granulozyten genutzt, obwohl für manche Antikörper eine schwache

Kreuzreaktion mit dem Ly6C-Antigen auf Monozyten beschrieben ist (Enzmann et al., 2013).

Reagenz	Verdünnung	Hersteller
Rat-anti-Ly6G NIMP	1:500	Abcam, Cambridge, UK
Goat-anti-mouse Alexa Fluor 546	1:200	Invitrogen, Carlsbad, USA
DAPI	-	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 4: Reagenzien Immunhistochemie.

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Objektträger dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen und für eine Stunde mit einem Puffer aus PBS und 5 %igem Ziegenerum behandelt. Auf diese Weise wurden die Fc-Teile noch vorhandener Mausantikörper durch Ziegenantikörper gebunden und eine Fehlbesetzung des Sekundärantikörpers verhindert. Nach anschließender Applikation des Primärantikörpers inkubierten die Schnitte über Nacht bei 4 °C in der Feuchtkammer. Am Folgetag wurde der Sekundärantikörper nach erneutem gründlichen Waschen mit PBS aufgetragen. Dieser verblieb zwei Stunden bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer auf den Präparaten. Die abschließende Kernfärbung mit DAPI erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Objektträger mit Fluorescence Mounting Medium (Agilent Dako, Santa Clara, USA) eingedeckelt. Es wurde immer der erste der drei Schnitte auf einem Objektträger verwendet und eine Negativkontrolle mit alleiniger Gabe des Sekundärantikörpers mitgeführt. War der erste Schnitt aufgrund von Überlagerungen, Rissen oder fehlenden Stücken untauglich, wurde der zweite Schnitt gefärbt.

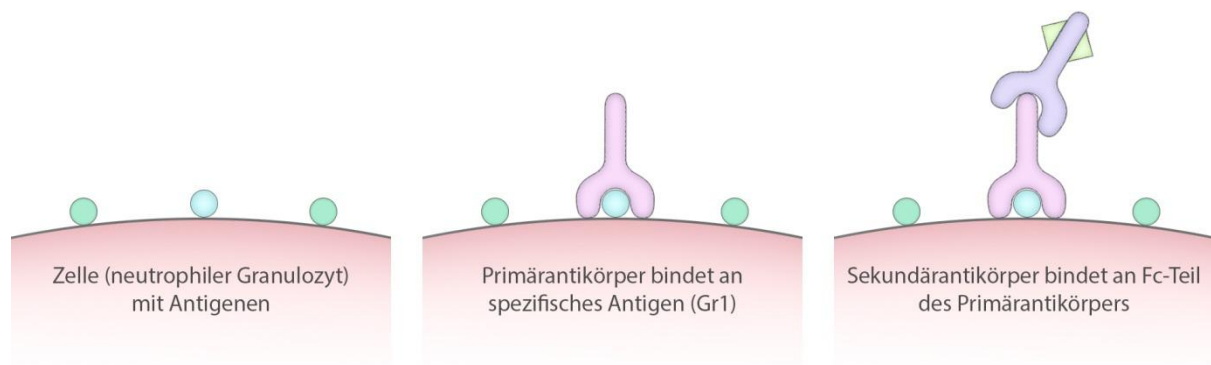


Abbildung 9: Schema der indirekten antikörpervermittelten Färbemethode. Abgebildet wird das Primär-Sekundär-Antikörper-Prinzip. Der primäre Antikörper bindet an das zu detektierende Oberflächenantigen der Zielzelle, wohingegen der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper gegen das Fc-Segment des Primärantikörpers gerichtet ist. Auf diese Weise wird eine indirekte Färbung des Zielantigens vorgenommen.

Während der Etablierungsphase konnten die optimalen Verdünnungen des Primär- und Sekundärantikörpers mittels einer Verdünnungsreihe ermittelt werden. Für den Primärantikörper zeigte sich das beste Färbeergebnis bei einer 1:500 Verdünnung. Für den Sekundärantikörper wurde nach dem Vergleich einer 200-, 400- und 600-fachen Verdünnung die erste Variante gewählt.

3.10.4 Differenzierung von Granulozyten und Monozyten

Aufgrund einer möglichen Kreuzreaktivität des eingesetzten Gr1-Antikörpers gegen das auf Monozyten befindliche Ly6C (Enzmann et al., 2013), wurde eine repräsentative Population der gefärbten Zellen am Konfokalmikroskop LSM 710 (Zeiss, Jena) anhand ihrer Zellkernmorphologie beurteilt. Es erfolgte eine Unterscheidung in stabbeziehungsweise segmentkernige Neutrophile und Monozyten mit bohnenförmig konfiguriertem Kern mit einem 40-fach-Objektiv. Die Wahl der untersuchten Objektträger und Präparatausschnitte wurde zufällig getroffen.

3.10.5 Immunhistochemische Auszählung

In Ergänzung zur Durchflusszytometrie erfolgte die Quantifizierung eingewanderter Gr1-positiver Granulozyten in ausgewählten Koronarschnitten des Mausgehirns nach immunhistochemischer Färbung. Da die neutrophilen Granulozyten sehr heterogen verteilt waren, wurden alle antikörpermarkierten Zellen manuell gezählt. Dadurch konnte eine maximale Genauigkeit erreicht werden. Es wurden insgesamt drei Schnitte pro Hirn ausgewertet, ein Schnitt aus dem Infarktzentrum und jeweils jeder achte Objektträger rostral und kaudal davon. Aus Ergebnissen vorheriger Studien unserer Arbeitsgruppe ließ sich das Infarktzentrum im Bereich von Bregma +0,5 bestimmen (Abbildung 10 A und B). Bei einer Schnittdicke von 20 µm und 3 Schnitten pro Objektträger wurde somit ca. 1 mm des Infarktkerns untersucht. Die individuelle Markierung aller neutrophiler Granulozyten im betrachteten Bereich ermöglichte die Darstellung der räumlichen Verteilung und der Zellmorphologie.

Die Zählung erfolgte an einem aufrechten Zeiss Mikroskop vom Typ Axio Imager mit stereologischem Aufsatz von MicroBrightField (MBF) mithilfe des Werkzeugs „Optical Fractionator“ der Software Stereo Investigator (MBF, Inc., Williston, VT). Es wurde der Stereo Investigator Software-Assistent zur automatischen Durchmusterung der Proben benutzt. Ausgewertet wurde die ischämische und kontralaterale Hemisphäre eines Koronarschnitts. Dank der Markierungsfunktion konnte die Lokalisation sowie Eigenschaftsausprägung neutrophiler Granulozyten festgehalten werden. Mit

einem 10-fach-Objektiv (Zeiss, Jena) wurde entlang des Interhemisphärenspalts und der Meningen mit einem Abstand von ca. 1/8-Bildausschnitthöhe ein Interessengebiet (Region of Interest, ROI) um jeweils die gesamte ischämische und kontralaterale Hemisphäre gelegt. Nachfolgend generierte das Programm ein zufälliges Zählgitter innerhalb der ausgewählten Region (Counting Grid). Jede Gitterzelle begrenzte so einen umschriebenen Bereich (Fraktion, Counting Fraction), wobei alle Bereiche lückenlos nebeneinander lagen (Abbildung 10 C). Im Mittel wurden 100 bis 150 Fraktionen pro ROI bewertet.

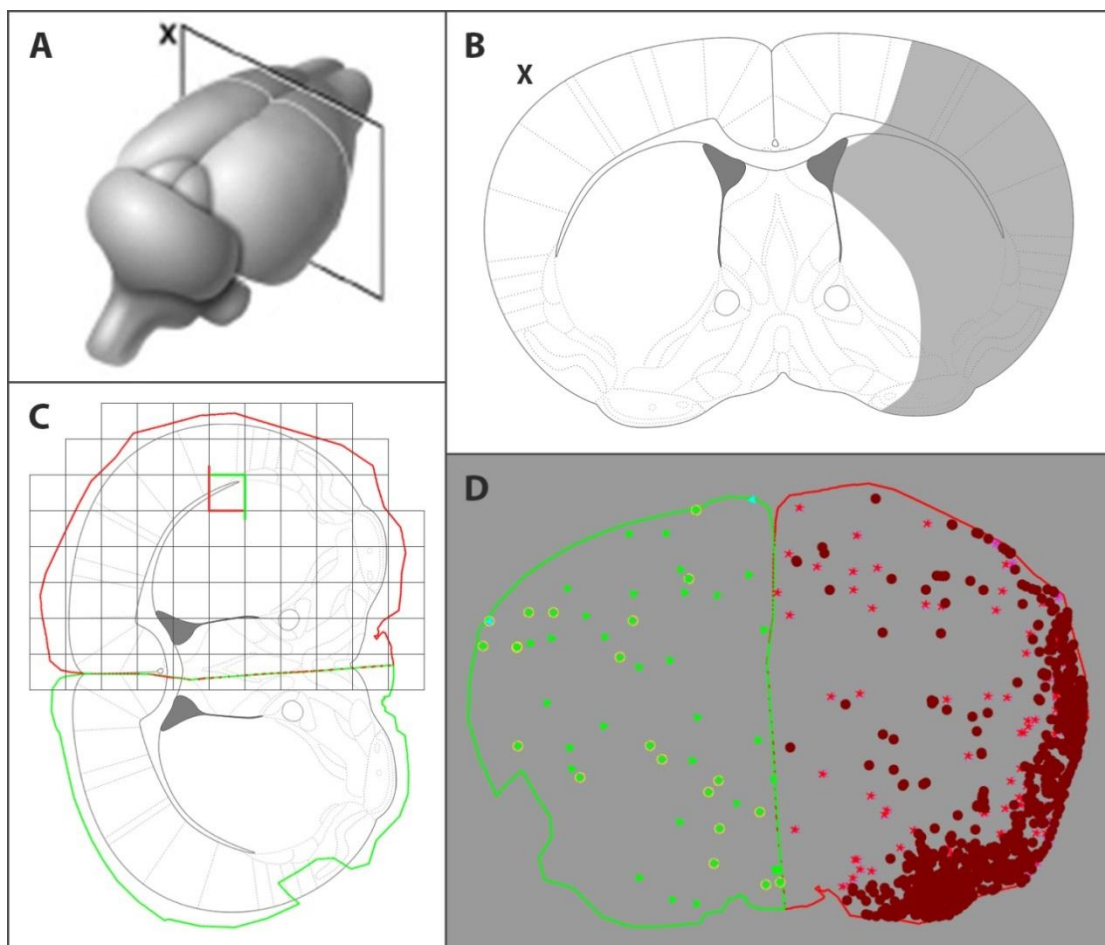


Abbildung 10: Prozess der Quantifizierung von neutrophilen Granulozyten nach immunhistochemischer Färbung. (A) Dargestellt wird die Lokalisation des mittleren der drei ausgewerteten Koronarschnitte bei Bregmabereich +0,5 (X) in einer Aufsicht auf das Maushirn. Jeweils 480 µm kranial und kaudal wurde ein weiterer Schnitt beurteilt, sodass insgesamt ca. 1 mm des Infarktkeims in die Auswertung einbezogen wurde. (B) Der koronare Schnitt (X) bei Bregmaposition +0,5 zeigt das markierte Infarktareal. (C) Im gesamten Schnitt wurden antikörpermarkierte Neutrophile manuell gezählt. Dafür wurde durch das verwendete Zählprogramm ein Zählgitter zufällig über einen vorher ausgewählten Interessenbereich gelegt (rote Umrandung = ipsilateral, grüne Umrandung = kontralateral) und automatisch abgefahren, sodass jede einzelne Gitterzelle in einem Zählrahmen (rot-grünes Quadrat) ausgewertet wurde (nicht maßstabsgetreu). (D) In jeder Zelle des Zählgitters wurden neutrophile Granulozyten mit zwei Symbolen markiert (roter Stern/gefülltes grünes Dreieck = intrazerebral, pinker Stern/blau gefülltes grünes Dreieck = meningeal, roter Kreis/gelber Kreis = rund, pinkes Kreuz/leeres grünes Dreieck = stäbchenförmig, für ipsilateral/kontralateral). Am Ende des Prozesses ergab sich ein koronarer Schnitt mit allen markierten neutrophilen Granulozyten.

Durch Variationen in der Höhe der Schnitte (z-Bereich) können bei volumetrischen Berechnungen Fehler auftreten. In diesem Experiment konnte durch die Zählung aller markierten Zellen aber eine definierte standardisierte Schnitthöhe (Optical Disector) festgelegt werden, die den gesamten z-Bereich des Schnittes abdeckte. Mögliche Fehler durch Schrumpfungsartefakte konnten so umgangen werden. In der Stereologie werden die eben eingeführten Größen genutzt, um mithilfe eines festgelegten Zählschemas annähernd unverzerrt durch systematische Fehler eine statistisch fundierte Abschätzung der tatsächlichen Zellzahl vorzunehmen.

Die Zählung wurde mit einem 20-fach-Objektiv (Zeiss, Jena) durchgeführt. So ließen sich bei ausreichend großem Bildausschnitt alle neutrophilen Granulozyten bei der Durchmusterung des Schnittes in z-Richtung unterscheiden. Die basal gelegenen Nervi olfactorii wurden von der Zählung ausgespart. Beurteilt wurden die Lokalisation und die Form der neutrophilen Granulozyten. Jede Zelle wurde dabei mit jeweils zwei Symbolen für intrazerebral oder meningeal sowie rund oder stäbchenförmig versehen (Abbildung 10 D). Die Lage zu den Rahmengrenzen konnte vernachlässigt werden, da jede Fraktion beurteilt wurde und Markierungen über die Grenzen hinaus sichtbar waren. Nicht gezählt wurden übermäßig leuchtende, unregelmäßig konfigurierte und untypisch große gefärbte Partikel. Diese entsprachen Artefakten oder Verunreinigungen. In die Auswertung einbezogen wurden somit alle antikörpermarkierten Zellen mit annähernd runder beziehungsweise stäbchenförmiger Morphologie und charakteristischer Größe. Es wurde immer die Mitte der Zelle mit dem jeweiligen Symbol markiert.

3.10.6 Darstellung der räumlichen Verteilung

Um die räumliche Verteilung durch messbare Größen vergleichbar zu machen, wurden aus den Übersichtsbildern der Neutrophilenzählung mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ Analysen nach dem Verfahren „Nearest Neighbor“, durchgeführt und Voronoi-Diagramme angefertigt. Durch beide Methoden konnten Informationen zur Anzahl und zum relativen Abstand der Zellen untereinander gesammelt werden. Sie finden unter anderem Anwendung in der biomedizinischen Forschung und wurden bereits zur Beschreibung der räumlichen Verteilung von Zielzellen eingesetzt (Cheng et al., 2014; Choe et al., 2016).

Der Nearest-Neighbor-Algorithmus wird in der Wahrscheinlichkeitsrechnung genutzt, um Dichtefunktionen darzustellen ohne dass vorher eine bestimmte Wahrscheinlichkeitsverteilung angenommen wird. Daher eignet er sich zur Beschreibung der räum-

lichen Verteilung regellos angeordneter Objekte. Er überprüft den bestmöglichen Zustand für die Verbindung jedes einzelnen Objekts der Grundgesamtheit mit einem oder mehreren Nachbarn. Dieser Vorgang wird parallel für alle Objekte durchgeführt. Im Ergebnis lassen sich die im Gesamten betrachteten niedrigsten Abstandswerte für alle Objekte ermitteln (Abbildung 11 A). Wählt man lediglich den nächsten Nachbarn zum Objekt, kann ein Voronoi-Diagramm erstellt werden. Bei diesem Algorithmus werden Grenzpunkte zwischen definierten Objekten (Zentren) zum Ausgang einer Flächengenerierung genutzt (Abbildung 11 B). Die entstandenen Flächen stehen in Bezug zur räumlichen Verteilung. Je dichter die Zentren beieinander liegen, desto kleiner sind die Voronoi-Regionen. Somit entsteht eine Netzdarstellung mit verschiedenen dichten Maschen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zentren durch neutrophile Granulozyten gebildet.

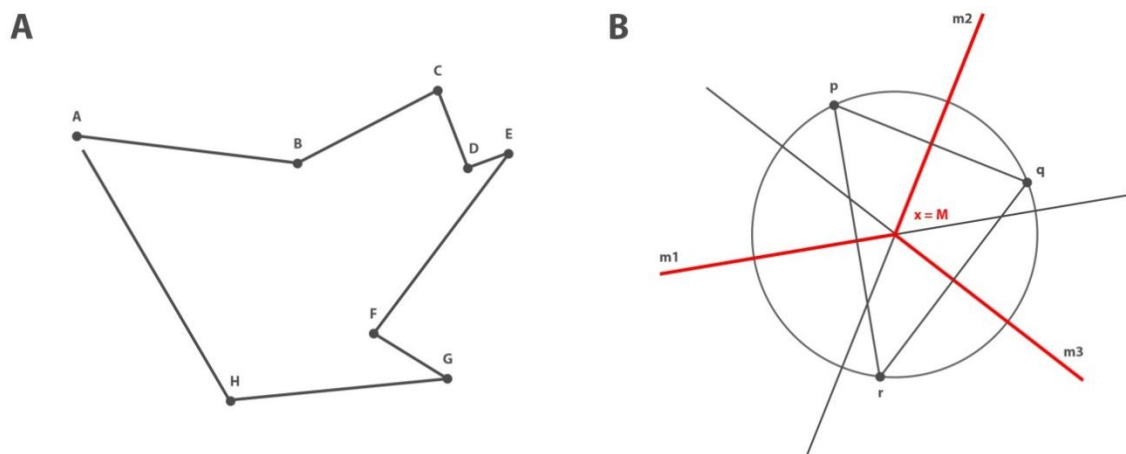


Abbildung 11: Prinzip der Nearest-Neighbor-Analyse und des Voronoi-Diagramms. (A) Mithilfe der Nearest-Neighbor-Analyse lassen sich Nachbarschaftsbeziehungen von Objekten darstellen. Dabei wird ein Anfangsobjekt A gewählt, von dem aus der nächste Nachbar B gesucht wird. Nachfolgend wird von diesem Objekt der nächstgelegene Punkt C ermittelt ohne jedoch den vorherigen in die Suche einzubeziehen. Es wird solange fortgefahren, bis alle Objekte analysiert wurden. **(B)** Eine weitere Methode zur Prüfung der Abstandverhältnisse ist die Veranschaulichung durch Voronoi-Diagramme. Hierbei werden Objekte (Punkte) (x_{1-k}) hinsichtlich ihres Abstandes festgelegten Zentren (p, q, r) zugeordnet, sodass Cluster entstehen, die als Voronoi-Regionen bezeichnet werden. Punkte, die denselben Abstand zu zwei Zentren haben, heißen Grenzpunkte. Sie sind Mittelpunkte von Umkreisen, auf deren Peripherie beide Zentren liegen. Alle Grenzpunkte verbunden bilden Voronoi-Linien. Voronoi-Linien entsprechen den Mittelsenkrechten (m_1, m_2, m_3) der Umkreise. Der Schnittpunkt von mindestens drei Voronoi-Linien, also Mittelsenkrechten desselben Umkreises um einen Punkt ($x = M$), wird als Voronoi-Knoten bezeichnet. Die entstandenen Voronoi-Regionen besitzen unterschiedliche Flächeninhalte, die umso kleiner sind, je dichter die Zentren beieinander liegen.

Für die Analyse wurden die Bilder mit dem Programm ImageJ bearbeitet. Ein Plugin für die Nearest-Neighbor-Analyse wurde vor der Bearbeitung installiert (Nnd-Plugin). Es erfolgte die Umwandlung der Farbdatei in ein 8-bit-Grauwertbild. Die Ausdehnung der neutrophilen Granulozyten spielte bei der Auswertung durch das Bildbearbeitungsprogramm keine Rolle, da sie bei der Zählung als einzelne Vektorbildpunkte

markiert wurden. Nachdem mithilfe eines Schwellenwerts alle Punkte der gewünschten Granulozytengruppe binarisiert und ausgewählt wurden, konnte das Nnd-Plugin angewendet werden. Die relativen Abstände wurden als Bildpunkte angegeben, wobei in der endgültigen Auswertung Abstandintervalle zu je 5 Bildpunkten gebildet wurden (< 5 , < 10 , < 15 , < 20 , < 25 und ≥ 25 Bildpunkte). Visualisiert wurden die Nachbarschaftsbeziehungen durch die Darstellung der Bilder in Voronoi-Diagrammen (Voronoi-Plugin). Auch diese Bearbeitung konnte über das Programm ImageJ verwirklicht werden. Für die leichtere Orientierung wurde diesmal der Schwellenwert so gelegt, dass nicht nur die neutrophilen Granulozyten sondern auch die Umrandung der Hemisphäre (ROI) in der Auswahl lag. Das auf diese Weise erhaltene Schwarz-Weiß-Bild wurde konvertiert und das Voronoi-Plugin angewendet.

3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Darstellung der ermittelten Werte wurde mit der Software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA.) vorgenommen.

Die Daten der FACS-Analyse wurden als Mittelwert \pm einfacher Standardabweichung dargestellt. Sie unterliefen einer einfaktoriellen Varianzanalyse (One-Way ANOVA, Analysis of Variance), bei der der dosisabhängige Einfluss von G-CSF auf die Zahl der analysierten Zellpopulationen in Blut und Gehirn untersucht wurde. Verglichen wurden die Versuchsgruppen Naiv, Scheinschlaganfall und MCAO sowie MCAO mit G-CSF-Behandlung in niedriger und hoher Dosierung. Gruppenunterschiede wurden nach entsprechender Bonferroni-Korrektur bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angegeben.

Die Quantifizierung neutrophiler Granulozyten im Hirnparenchym und den umgebenden Hirnhäute mittels Immunhistochemie wurde als Mittelwert \pm einfacher Standardabweichung dargestellt. Der Einfluss der G-CSF-Dosis auf die Gesamtzahl eingewanderter Granulozyten (je Hirnhälfte) sowie auf deren Lokalisation und Morphologie wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse getestet. Dabei wurde die unbehandelte MCAO-Gruppe mit niedrig- und hochdosierter G-CSF-Therapie verglichen. Eine statistische Signifikanz für die Gruppenunterschiede ergab sich nach entsprechender Bonferroni-Korrektur bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$. Für die Daten der Nearest-Neighbor-Analyse zur Darstellung der räumlichen Verteilung kam für jeden Abstandsbereich ebenfalls eine einfaktorielle Varianzanalyse zum Einsatz.

4 Ergebnisse

4.1 Durchflusszytometrie

4.1.1 Veränderungen des Körper- und Milzgewichts

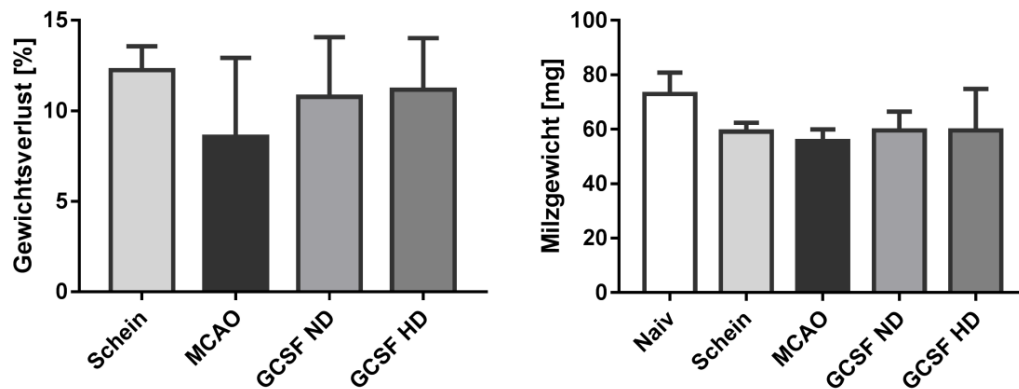


Abbildung 12: Darstellung der mittleren Körper- und Milzgewichte. Die Abbildung zeigt den prozentualen Gewichtsverlust und die Milzgewichte nach 24 Stunden von Versuchstieren mit Scheinschlaganfall (n = 4), MCAO (n = 7), MCAO und Niedrigdosistherapie (GCSF-ND, n = 6) sowie MCAO und Hochdosistherapie (GCSF HD, n = 6) als Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Weder für die prozentuale Körpergewichtsabnahme noch für das absolute Milzgewicht ergaben sich signifikante Unterschiede, wobei das Körpergewicht im Mittel um 10 % abnahm und das Milzgewicht in allen Schlaganfallgruppen verglichen mit Naiv erniedrigt war (MCAO p = 0,0642 Naiv vs. MCAO). Die statistische Auswertung wurde mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse durchgeführt. Folgende Paarungen wurden verglichen: Naiv vs. Schein, Naiv vs. MCAO, Schein vs. MCAO, MCAO vs. GCSF ND, MCAO vs. GCSF HD und GCSF ND vs. GCSF HD.

Das mittlere Körpergewicht aller Versuchsgruppen vor transientser Okklusion der mittleren Hirnarterie war gleich. Infolge der Operation trat ein Gewichtsverlust von durchschnittlich ca. 10 % auf, der zwischen den verschiedenen Experimentalgruppen nicht signifikant variierte. Interessanterweise führte auch der Scheinschlaganfall zu einer Gewichtsabnahme in gleicher Größenordnung. Die Behandlung mit G-CSF hatte keinen Einfluss auf den Gewichtsverlust.

Das mittlere Milzgewicht war im Vergleich zu gesunden altersgleichen C57BL/6-Mäusen (73 mg ± 8 mg) in allen Versuchsgruppen reduziert mit deutlichstem Unterschied zur MCAO-Gruppe (p = 0,0642). Hierbei konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Scheinschlaganfall und Schlaganfall sowie den G-CSF-Behandlungsgruppen festgestellt werden.

4.1.2 Immunzellpopulationen im peripheren Blut

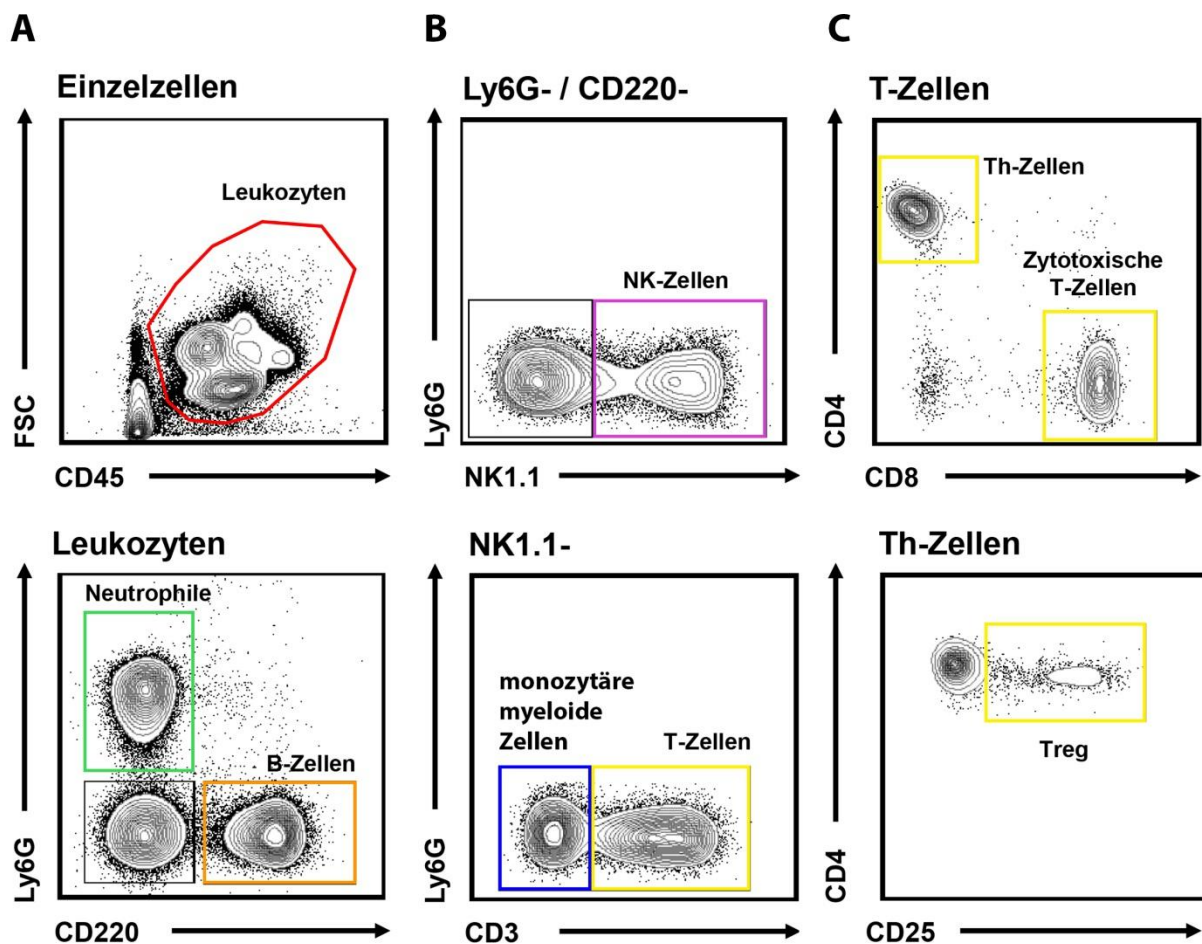


Abbildung 13: Gatingstrategie von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems im peripheren Blut. Die Abbildung zeigt die Trennung der leukozytären Subpopulationen anhand ihrer charakteristischen Oberflächenantigene. **(A)** Unterscheidung von CD45-positiven Leukozyten in CD220-positive B-Lymphozyten und Ly6G-positive neutrophile Granulozyten. **(B)** Weitere Unterteilung in NK1.1-positive natürliche Killerzellen, CD3-positive T-Lymphozyten und doppeltnegative monozytäre myeloide Zellen. **(C)** Auftrennung CD3-positiver T-Zellen in CD8-positive zytotoxische T-Zellen, CD4-positive T-Helferzellen und CD4/CD25-positive regulatorische T-Zellen (Treg).

24 Stunden nach Okklusion der mittleren Hirnarterie wurde peripheres Blut entnommen und mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht, um mögliche periphere immunologische Effekte von G-CSF aufzudecken. Innerhalb der CD45-positiven Leukozytenpopulation wurden zunächst die CD220-positiven B-Zellen separiert. Von den verbleibenden Zellen konnten neutrophile Granulozyten durch das Oberflächenantigen Ly6G abgetrennt werden (Abbildung 13 A). Die übrigen Zellen wurden weiter unterteilt in CD3-positive T-Lymphozyten, NK1.1-positive natürliche Killerzellen und für beide Oberflächenmarker negative monozytäre myeloide Zellen (Abbildung 13 B). CD3-positive T-Zellen wurden zudem in CD8-positive zytotoxische T-Zellen, CD4-positive T-Helferzellen und regulatorische CD4/CD25-positive T-Lymphozyten unterschieden (Abbildung 13 C).

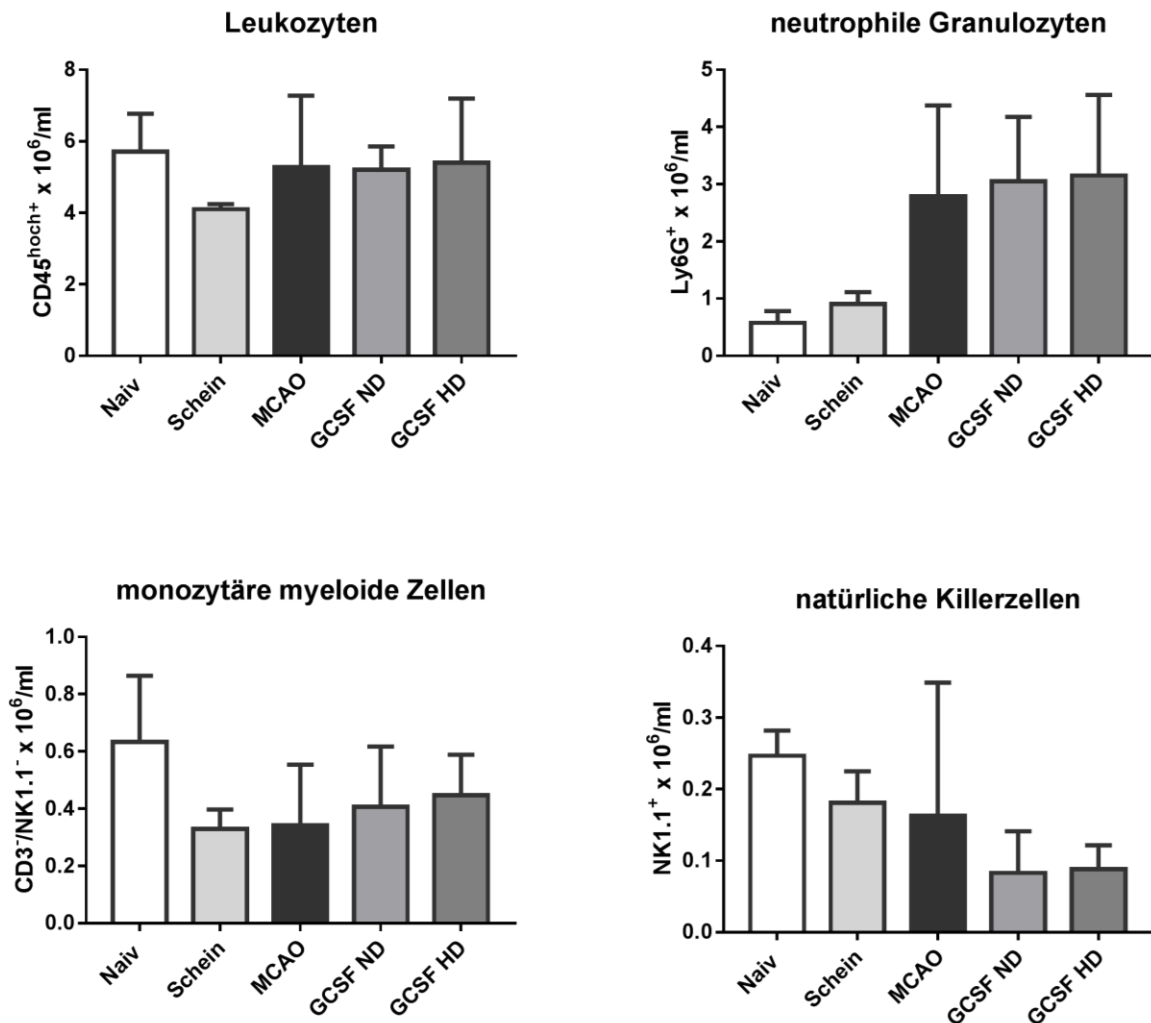


Abbildung 14: Gesamtleukozytenzahl und durchflusszytometrische Quantifizierung von Zellen des angeborenen Immunsystems im peripheren Blut. Weder die operative Prozedur noch der Schlaganfall selbst oder die begleitende G-CSF-Therapie führten 24 Stunden nach Okklusion der mittleren Hirnarterie zu einer Veränderung der Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut. Auch die Anzahl Ly6G-positiver neutrophiler Granulozyten variierte nicht signifikant, wenngleich sich ein Trend zu höheren Neutrophilenzahlen in allen Schlaganfallgruppen finden ließ. Monozytäre myeloide Zellen und natürliche Killerzellen wurden ebenso wenig durch die Operation, Ischämie oder G-CSF-Applikation, egal welcher Dosierung, beeinflusst. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Gruppen Naiv ($n = 3$), Scheinschlaganfall ($n = 3$), MCAO ($n = 5$), Niedrigdosis ($n = 6$) und Hochdosis ($n = 6$) wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse beurteilt. Verglichen wurden Naiv vs. Schein, Naiv vs. MCAO, Schein vs. MCAO, MCAO vs. GCSF ND, MCAO vs. GCSF HD und GCSF ND vs. GCSF HD.

Entgegen der Annahme führte weder die operative Prozedur noch die begleitende G-CSF-Therapie zu einer signifikanten Veränderung der Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut. Der Schlaganfall selbst ließ die Anzahl im Vergleich zum Scheinschlaganfall leicht ansteigen ($p = 0,12$). Auch die Zahl zirkulierender Granulozyten unterschied sich nicht signifikant zwischen den Experimentalgruppen. Hier zeigte sich allerdings ein Trend zu deutlich höheren Mittelwerten in den Schlaganfallgruppen ($p = 0,136$ Naiv vs. MCAO). Ein signifikanter Effekt wurde möglicherweise durch die hohen Standardabweichungen bei relativer kleiner Gruppengröße verdeckt. In-

nerhalb der Schlaganfallgruppen resultierte die Behandlung mit G-CSF nicht in einer zusätzlichen Mobilisation neutrophiler Granulozyten. So machten neutrophile Granulozyten nach tMCAO etwa die Hälfte aller Leukozyten aus, während ihr Anteil in gesunden Tieren nur ca. 10 % betrug (Abbildung 16). Die Anzahl monozytärer myeloider Zellen im peripheren Blut unterschied sich ebenso wenig wie die NK-Zellzahl signifikant zwischen den Experimentalgruppen.

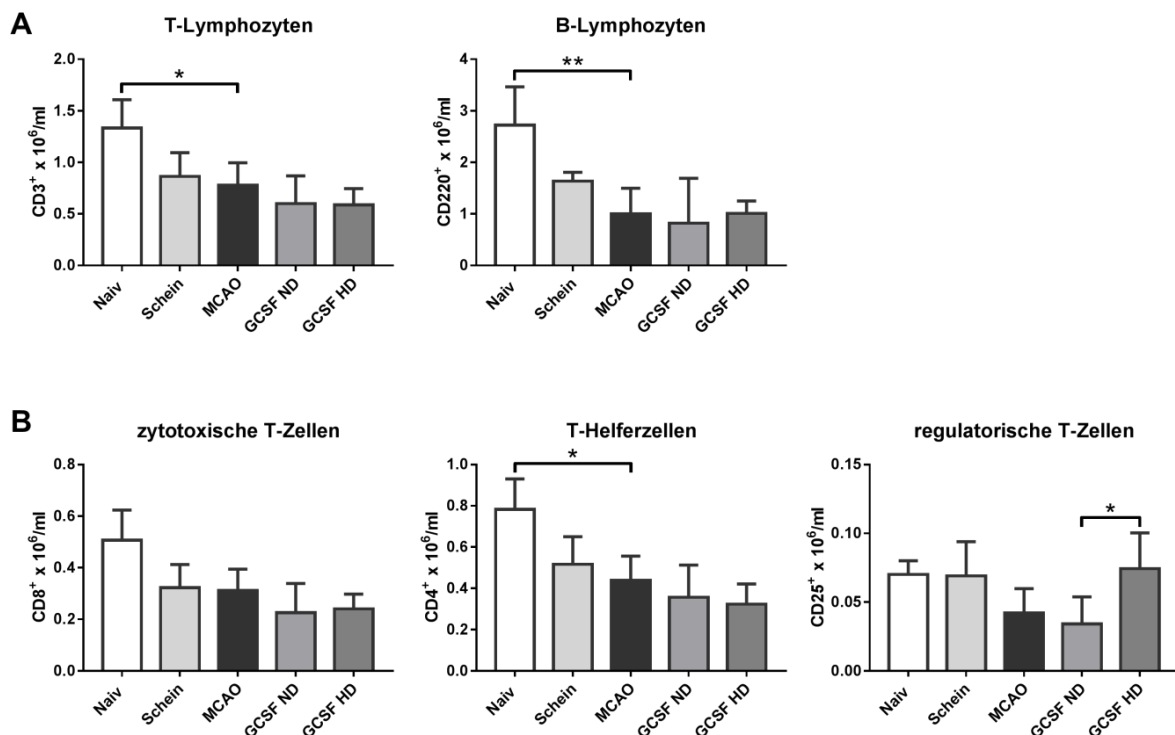


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Quantifizierung von Zellen des adaptiven Immunsystems im peripheren Blut. (A) Auffällig war eine signifikante Reduktion von T-Lymphozyten ($p < 0,05$) und B-Lymphozyten ($p < 0,01$) im peripheren Blut 24 Stunden nach tMCAO im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. (B) Sie kann primär auf einen Abfall der T-Helferzellen ($p < 0,05$) zurückgeführt werden, wobei auch zytotoxische T-Zellen deutlich abnahmen. Die G-CSF-Behandlung führte zu keinen relevanten Verschiebungen innerhalb der Lymphozytensubpopulationen bis auf eine signifikante Zunahme CD4/CD25-positiver regulatorischer T-Zellen in der Hochdosisgruppe ($p < 0,05$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung für Naiv ($n = 3$), Scheinschlaganfall ($n = 3$), MCAO ($n = 5$), Niedrigdosis ($n = 6$) und Hochdosis ($n = 6$) dargestellt und wurden mittels einfaktorier Varianzanalyse mit nachfolgender Bonferroni-Korrektur beurteilt. Der Vergleich fand zwischen Naiv vs. Schein, Naiv vs. MCAO, Schein vs. MCAO, MCAO vs. GCSF ND, MCAO vs. GCSF HD und GCSF ND vs. GCSF HD statt.

Dagegen führte der Schlaganfall zu einer signifikanten Abnahme der T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 15 A, B-Lymphozyten $p < 0,01$, T-Lymphozyten $p < 0,05$, jeweils gegenüber Naiv). Sie ist als Ausdruck der beginnenden peripheren Immundepression zu werten, die in der Regel 3 bis 4 Tage nach tMCAO ihr Maximum erreicht. Die vormals zellreichste Fraktion der B-Lymphozyten sank um mehr als die Hälfte von 40 % auf 17 %. T-Lymphozyten, die in gesunden Tieren am zweithäufigsten gezählt werden

konnten, nahmen von 20 % auf 13 % ab (Abbildung 16). Signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Schlaganfall-Gruppe und Tieren, die eine G-CSF-Therapie erhielten, fanden sich nicht.

Während sich für zytotoxische T-Zellen lediglich ein starker Trend zu niedrigeren Werten in den operierten Experimentalgruppen zeigte ($p = 0,0552$, Naiv vs. MCAO), fiel in der MCAO-Gruppe ein signifikanter Abfall der T-Helferzellen im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe auf ($p < 0,05$). G-CSF hatte keinen zusätzlichen Einfluss auf die T-Helferzellen, führte aber in der hohen Dosierung zu einer signifikanten Zunahme an regulatorischen T-Lymphozyten im Blut. Gegenüber der unbehandelten MCAO-Gruppe ergab sich lediglich ein Trend ($p = 0,1293$).

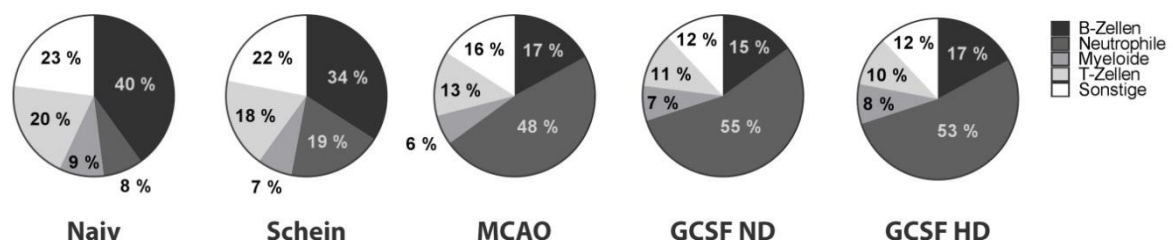


Abbildung 16: Darstellung der Leukozytensubpopulationen in prozentualen Werten. Während der Anteil an T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut 24 Stunden nach tMCAO etwa um die Hälfte sank, nahm der Prozentsatz neutrophiler Granulozyten infolge der Ischämie auf das ca. sechsfache zu. Die Behandlung mit G-CSF führte zu keiner signifikanten zusätzlichen Mobilisation. Myeloide Zellen hatten in allen Experimentalgruppen einen Anteil von im Mittel 7 %. Alle weiteren untersuchten Subgruppen wurden unter Sonstige subsummiert.

4.1.3 Immunzellpopulationen im Hirnisolat

24 Stunden nach Schlaganfall bzw. Scheinschlaganfall wurde das Immunzellinfiltrat in der vom Schlaganfall betroffenen Hirnhälfte mittels durchflusszytometrischer Analyse beurteilt und mit dem gesunder Versuchstiere verglichen. Hierbei konnten in einem ersten Schritt CD45-hochpositive eingewanderte Leukozyten von CD45-intermediärpositiven residierenden Mikrogliazellen unterschieden werden. Innerhalb der CD45-hochpositiven Population wurden T-Lymphozyten durch den zusätzlichen Marker CD3 und B-Lymphozyten durch die CD19-Expression abgegrenzt (Abbildung 17 A). Anschließend wurden neutrophile Granulozyten als CD11b/Ly6G-positiv identifiziert. Die übrigen CD11b-positiven Zellen wurden entweder durch F4/80 als Makrophagen klassifiziert oder anhand ihrer MHC-II- und Ly6C-Expression weiter unterschieden (Abbildung 17 B).

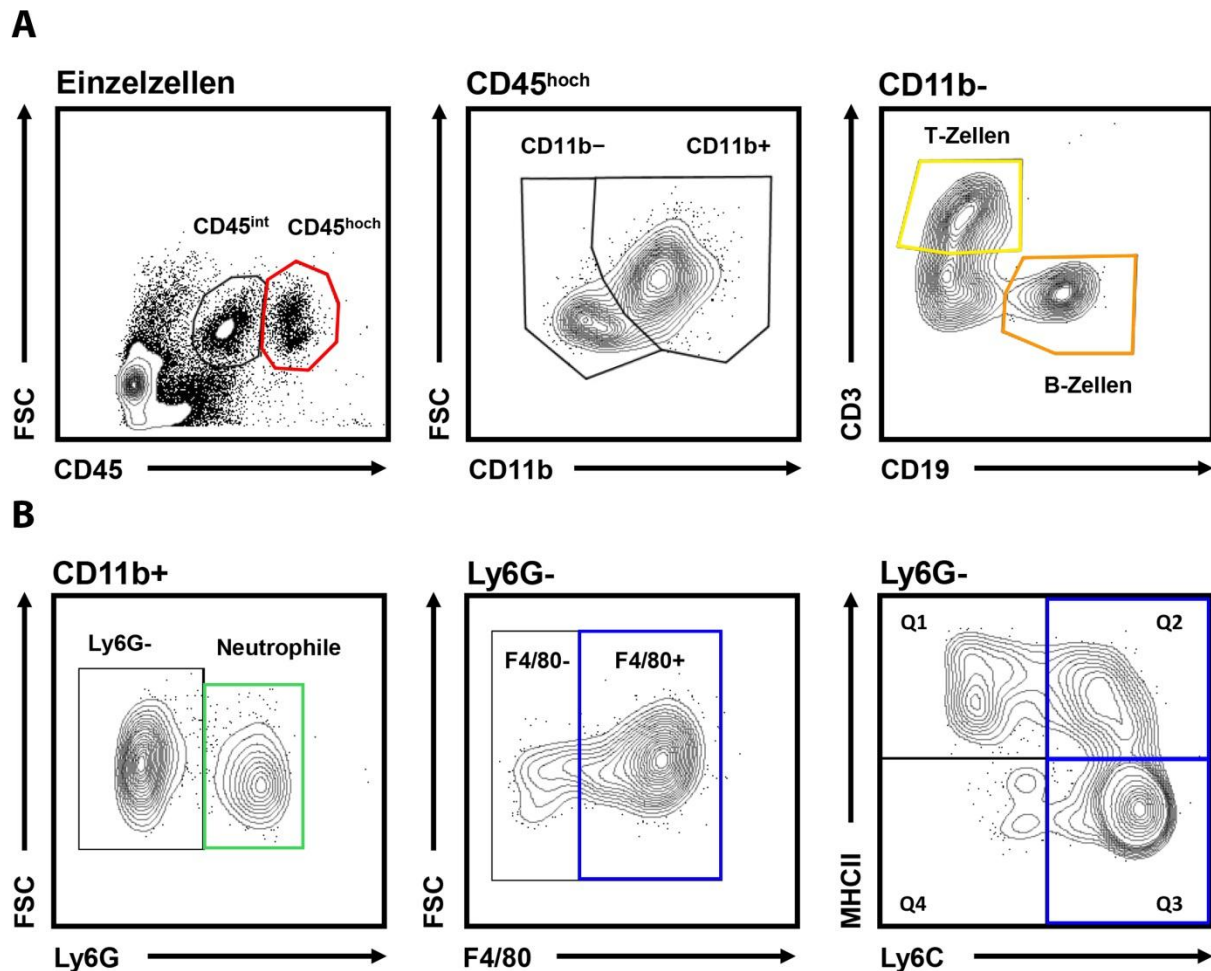


Abbildung 17: Gatingstrategie für eingewanderte Zellen des Immunsystems im ischämischen Maushirn. Die Abbildung zeigt die Gatingschemata zur Unterscheidung der eingewanderten Leukozytenpopulationen im ischämischen Hirn der Maus. **(A)** Nach Trennung der CD45-intermediärpositiven residierenden Mikroglia erfolgte die Subklassifizierung CD45-hochpositiver Leukozyten ($CD45^{hoch}$) in CD11b-positive infiltrierende myeloide Zellen, CD3-positive T-Lymphozyten und CD19-positive B-Lymphozyten. **(B)** Unterteilung CD11b-positiver Zellen in Ly6G-positive neutrophile Granulozyten, F4/80-positive Makrophagen und weitere Subpopulationen anhand der Expression von MHCII und Ly6C. In Q2 werden transformierende Monozyten und in Q3 inflammatorische Monozyten gezeigt.

Die Quantifizierung der Zellpopulationen mittels BD TruCount Beads ergab eine verstärkte Einwanderung von CD45-hochpositiven Leukozyten in die infarzierte Hemisphäre von Mäusen, die mit der hohen G-CSF-Dosis behandelt wurden, verglichen mit der unbehandelten Schlaganfallgruppe und der G-CSF-Niedrigdosisgruppe (jeweils $p < 0,05$). Das ischämische Ereignis führte ebenfalls zu einer vermehrten Einwanderung, blieb aber ohne Signifikanz ($p = 0,1293$ Naiv vs. MCAO). Insgesamt waren im ischämischen Gehirn knapp dreimal mehr Leukozyten als in naiven und scheinoperierten Mäusen nachweisbar. Die Anzahl verdoppelte sich nochmals infolge der Therapie mit hoher G-CSF-Dosis (Abbildung 18). Dieser Unterschied wurde nicht durch neutrophile Granulozyten hervorgerufen, die in allen Schlaganfallgruppen in vergleichbarer Größenordnung nachweisbar waren, aber infolge des Schlag-

anfalls verstärkt ins Hirnparenchym einwanderten ($p < 0,05$ MCAO im Vergleich zu Schein und naiven Versuchstieren). So waren in ischämischen Maushirnen mehr als fünfmal so viele neutrophile Granulozyten als in jenen von scheinoperierten Tieren zu finden (Abbildung 18).

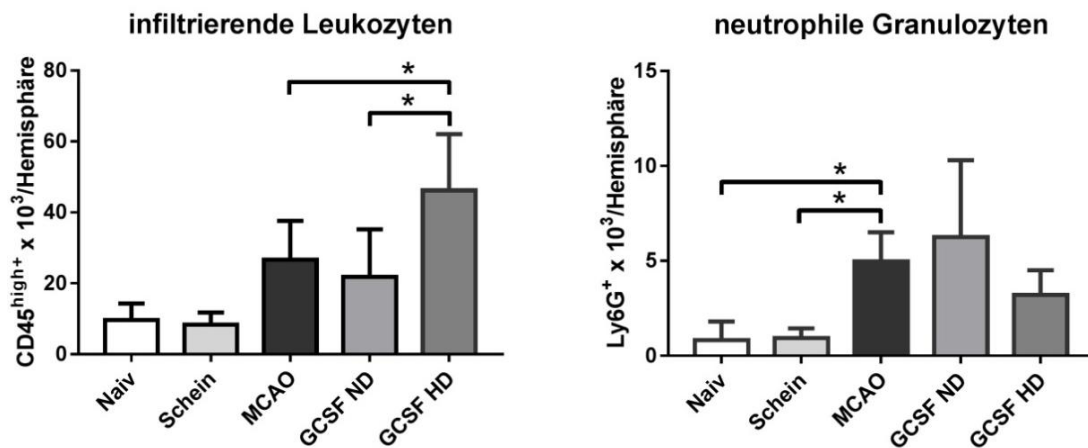


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Quantifizierung eingewanderter Leukozyten und neutrophiler Granulozyten im Hirnisolat. Mäuse, die eine Hochdosistherapie mit G-CSF erhielten, zeigten eine stärkere Einwanderung von Leukozyten in das Schlaganfallgeschädigte Gehirn als Versuchstiere mit Niedrigdosistherapie oder alleiniger Ischämie ($p < 0,05$). Neutrophile Granulozyten waren für diesen Unterschied nicht verantwortlich. Sie zeigten lediglich durch die tMCAO (im Vergleich zu naiven Mäusen und zur Scheinschlaganfallgruppe, jeweils $p < 0,05$) einen signifikanten Anstieg. Dargestellt werden die absoluten Zellzahlen von CD45-hochpositiven infiltrierenden Leukozyten und Ly6G-positiven neutrophilen Granulozyten als Mittelwert \pm Standardabweichung. Die statistische Bewertung erfolgte durch eine einfaktorielle Varianzanalyse und der Bonferroni-Korrektur für die Gruppen Naiv ($n = 3$), Scheinschlaganfall ($n = 4$), MCAO ($n = 7$), Niedrigdosis ($n = 5$) und Hochdosis ($n = 6$). Verglichen wurden Naiv vs. Schein, Naiv vs. MCAO, Schein vs. MCAO, MCAO vs. GCSF ND, MCAO vs. GCSF HD und GCSF ND vs. GCSF HD.

Stattdessen zeigten sich signifikant mehr Ly6C-positive inflammatorische Monozyten ($p < 0,01$ im Vergleich zu MCAO und $p < 0,001$ im Vergleich zu G-CSF ND) und Ly6C/MHC-II-positive Monozyten ($p < 0,01$ im Vergleich zu MCAO und $p < 0,001$ im Vergleich zu G-CSF ND) im Gehirn von Mäusen, die mit einer hohen G-CSF-Dosis behandelt wurden. Letztere entsprechen wahrscheinlich einer Population eingewanderter inflammatorischer Monozyten, die in situ in Makrophagen und dendritische Zellen differenzieren und daher für beide Oberflächenmarker positiv sind. Die Anzahl F4/80-positiver Makrophagen war in der G-CSF-Hochdosistherapiegruppe signifikant höher als in den Tieren, die mit der niedrigen Dosierung behandelt wurden ($p < 0,05$) und zeigten einen Trend im Vergleich zu Tieren die nur den Schlaganfall erlitten ($p = 0,1123$). Sie stellten mit nahezu einem Drittel aller Leukozyten überraschenderweise die mit Abstand größte Fraktion dar (Abbildung 19).

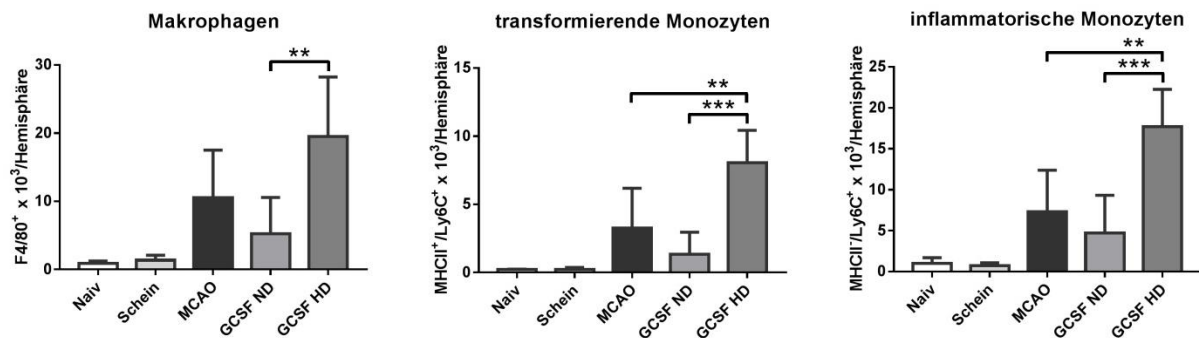


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Charakterisierung und Quantifizierung myeloider Zellpopulationen im Hirnisolat anhand der Oberflächenantigene F4/80, Ly6C und MHCII. CD11b-positive Leukozyten wurden anhand des Oberflächenantigens F4/80 als Makrophagen identifiziert. Sie zeigten nach Hochdosistherapie mit G-CSF einen signifikanten Anstieg ($p < 0,01$ im Vergleich zu GCSF ND). Auch inflammatorische Monozyten ($p < 0,01$ im Vergleich zu MCAO und $p < 0,001$ im Vergleich zu GCSF ND) und Ly6C/MHC-II-positive Monozyten, die wahrscheinlich einem doppelpositiven Transformationsstadium entsprechen, waren nach hochdosierter G-CSF-Therapie signifikant erhöht ($p < 0,01$ im Vergleich zu MCAO und $p < 0,001$ im Vergleich zu GCSF ND). Die Daten sind als Mittelwert mit einfacher Standardabweichung dargestellt und wurden 24 Stunden nach tMCAO erhoben. Die statistische Bewertung erfolgte durch eine einfaktorielle Varianzanalyse und die Bonferroni-Korrektur für die Gruppen Naiv ($n = 3$), Scheinschlaganfall ($n = 4$), MCAO ($n = 7$), Niedrigdosis ($n = 5$) und Hochdosis ($n = 6$). Verglichen wurden Naiv vs. Schein, Naiv vs. MCAO, Schein vs. MCAO, MCAO vs. GCSF ND, MCAO vs. GCSF HD und GCSF ND vs. GCSF HD.

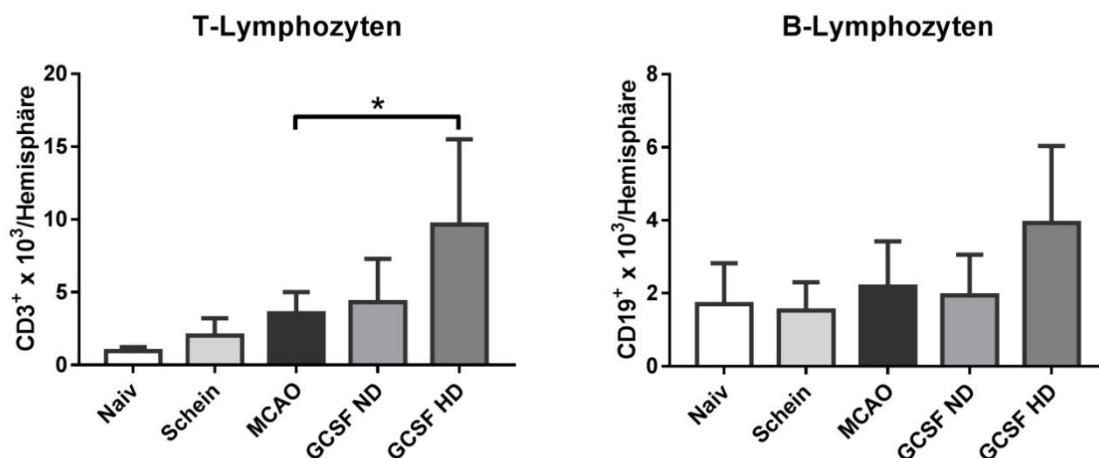


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Quantifizierung von B- und T-Lymphozyten im Hirnisolat. 24 Stunden nach MCAO zeigte sich eine signifikante Zunahme CD3-positiver T-Lymphozyten im ischämischen Gehirn von Mäusen, die mit einer Hochdosis-G-CSF-Therapie behandelt wurden ($p < 0,05$ im Vergleich MCAO). Die Anzahl der B-Lymphozyten war in allen Versuchsgruppen gleich und zeigte zu diesem Zeitpunkt auch keine Zunahme durch den Schlaganfall selbst. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung für die Gruppen Naiv ($n = 3$), Scheinschlaganfall ($n = 4$), MCAO ($n = 7$), Niedrigdosis ($n = 5$) und Hochdosis ($n = 6$) dargestellt. Die statistische Bewertung erfolgte durch eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur, wobei Naiv vs. Schein, Naiv vs. MCAO, Schein vs. MCAO, MCAO vs. GCSF ND, MCAO vs. GCSF HD und GCSF ND vs. GCSF HD verglichen wurde.

In ähnlicher Weise verstärkte die hochdosierte Behandlung mit G-CSF die Einwanderung von T-Lymphozyten in das ischämische Gehirn ($p < 0,05$ im Vergleich zu MCAO, $p = 0,0929$ im Vergleich Niedrigdosistherapie). Die B-Lymphozytenzahl im Hirnisolat blieb hingegen durch den Schlaganfall, ob mit oder ohne G-CSF-Behand-

lung, unbeeinflusst (Abbildung 20). Beide Populationen spielen zu diesem frühen Zeitpunkt der Entzündungsreaktion mit zusammen im Mittel 25 % erwartungsgemäß eine untergeordnete Rolle.

4.2 Immunhistochemie

4.2.1 Differenzierung von Monozyten und Granulozyten

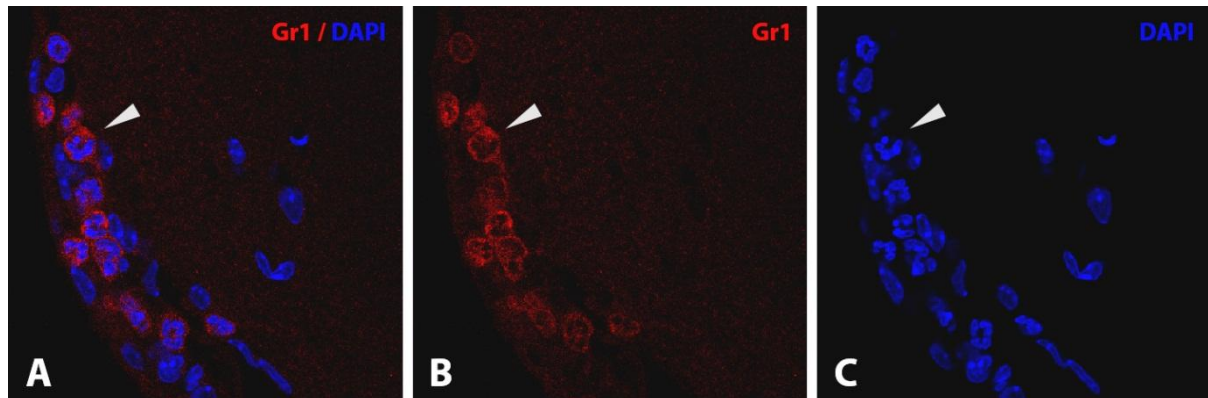


Abbildung 21: Differenzierung Gr1-positiver Zellen anhand ihrer Zellkernmorphologie. Aufgrund einer möglichen Kreuzreaktivität des verwendeten Gr1-Antikörpers gegen das Ly6C-Antigen auf Monozyten, wurden die Gr1-positiven Zellen in repräsentativen Ausschnitten anhand ihrer Zellkernmorphologie beurteilt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass fast ausschließlich (92 % der angefärbten Zellen) neutrophile Granulozyten durch den Gr1-Antikörper markiert wurden. Die übrigen Gr1-positiven Zellen konnten nicht eindeutig zugeordnet werden, zeigten aber nicht den typischen bohnenförmigen Kern eines Monozyten. **(A)** Im ersten Ausschnitt sieht man die kombinierte Darstellung der Färbungen Gr1 und DAPI. **(B)** Im zweiten Ausschnitt ist ausschließlich das Antigen Gr1 dargestellt. **(C)** Im dritten Ausschnitt werden alle durch DAPI blau gefärbten Zellkerne abgebildet. Ein neutrophiler Granulozyt mit deutlich segmentiertem Kern wird in allen Ausschnitten beispielhaft durch eine Pfeilspitze markiert (►). Nahezu alle neutrophilen Granulozyten im gezeigten Bildausschnitt liegen in der Hirnhaut. (40-fach-Objektiv, Zeiss)

Am Konfokalmikroskop LSM 710 (Zeiss, Jena) wurden neutrophile Granulozyten anhand ihres segmentierten Zellkernes von Monozyten unterschieden. Dies war wichtig, weil für den Gr1-Primärantikörper zur Neutrophilendetektion eine Kreuzreaktion mit dem auf Monozyten befindlichen Ly6C-Antigen beschrieben ist (Enzmann et al., 2013). Die Pfeilspitze in Abbildung 21 zeigt auf einen beispielhaft gewählten Gr1-positiven (Ly6G) roten neutrophilen Granulozyten mit durch DAPI blau gefärbten Zellkern. In insgesamt 35 Ausschnitten wurden 590 gefärbte Zellen hinsichtlich der Form ihres Zellkerns beurteilt. Hiervon konnten 541 signalanreichernde Zellen, also 92 %, den neutrophilen Granulozyten zugeordnet werden. 49 Zellen waren weder der einen noch der anderen Zellkernform zuzuordnen, sodass diese nicht sicher klassifiziert werden konnten. Keine der angefärbten Zellen zeigte die typische bohnen- oder nierenförmige Kernmorphologie eines Monozyten. Demnach erlaubt der in

dieser Arbeit verwendete Gr1-Antikörper eine eindeutige Identifizierung von neutrophilen Granulozyten.

4.2.2 Quantitative Analyse

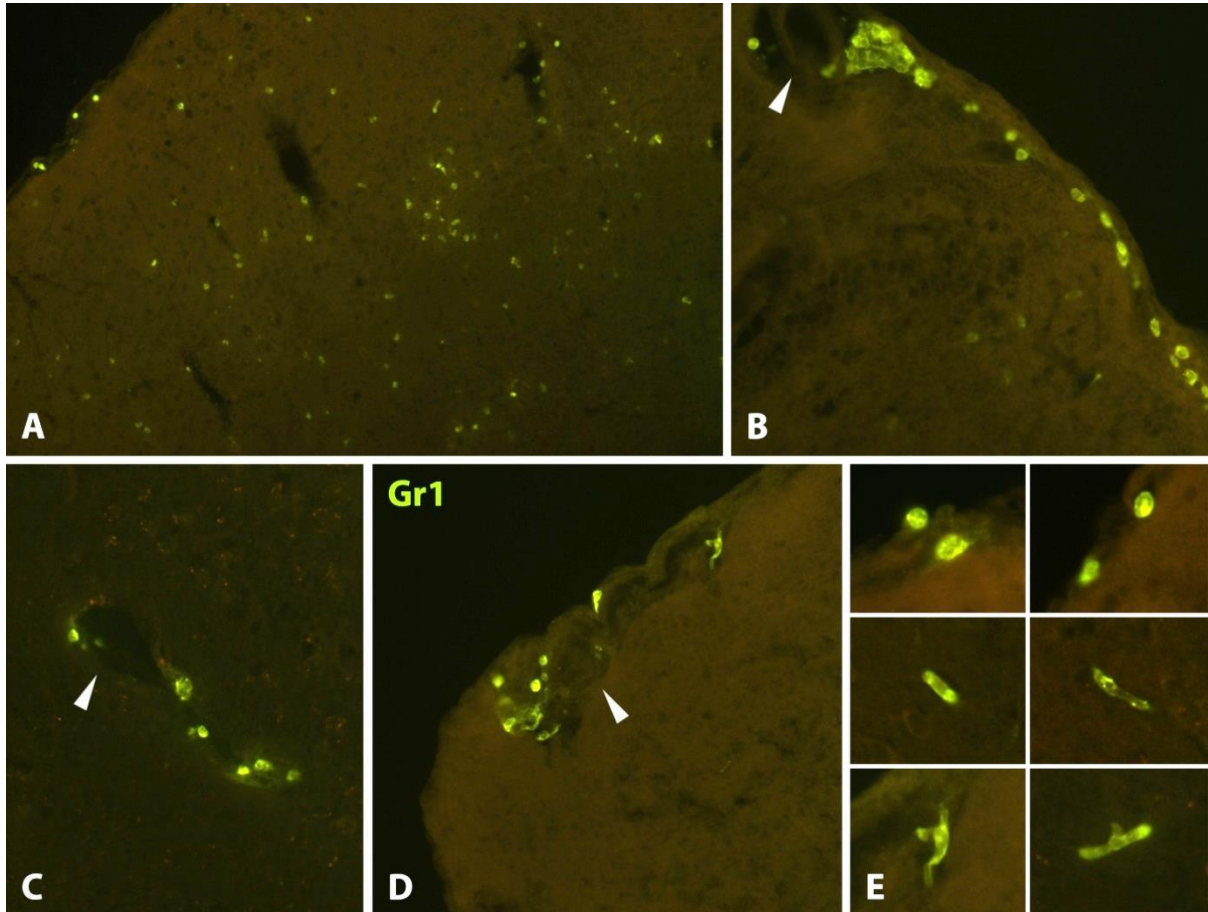


Abbildung 22: Gr1-positive Zellen in Koronarschnitten des Maushirns. Die Abbildung zeigt beispielhafte Ausschnitte von koronaren Hirnschnitten mit durch Immunfluoreszenzfärbung markierten neutrophilen Granulozyten. **(A)** Nahe des Infarktgebiets wiesen neutrophile Granulozyten eine dichte Besiedelung auf (10-fach-Objektiv, Zeiss). **(B)** In angrenzenden Hirnhäuten lagen überwiegend runde neutrophile Granulozyten perlschnurartig aufgereiht. **(B, D)** Eine verstärkte Ansammlung fand sich in und um meningeale(n) Gefäße(n) (▶) (20-fach-Objektiv, Zeiss). **(C)** Aber auch intrazerebral zeigten sich Gruppierungen von neutrophilen Granulozyten, die in oder um Gefäße(n) angesiedelt waren (▶) (20-fach-Objektiv, Zeiss). **(E)** Es konnten runde wenig gefäßadhärente oder intrazerebrale (1. Reihe) von stäbchenförmigen stark gefäßgebundenen neutrophilen Granulozyten unterschieden werden (2. Reihe). Letztere zeigten eine Sonderform mit sternförmiger Morphologie, wenn sie sich in Gefäßverzweigungen aufhielten, sich teilten oder aus dem Gefäß ins Parenchym transmigrierten (3. Reihe) (40-fach-Objektiv, Zeiss).

Im Rahmen der immunhistochemischen Analyse wurden die Gr1-positiven Zellen auf drei repräsentativen Koronarschnitten des Mäusegehirns im Abstand von 480 µm um das Infarktzentrum (Bregma +0,5) ausgezählt. Dabei bestätigten sich im Wesentlichen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Während der Auszählung fiel auf, dass sich neutrophile Granulozyten hinsichtlich ihrer Lokalisation und Zellform unterschieden. Neben der reinen Quantifizierung wurde deshalb auch eine Zuordnung zur

intrazerebralen oder meningealen Lage (Abbildung 22 A, B, C, D) und zur runden oder stäbchenförmigen Morphologie (Abbildung 22 E) vorgenommen.

4.2.2.1 Ipsilateral / kontralateral

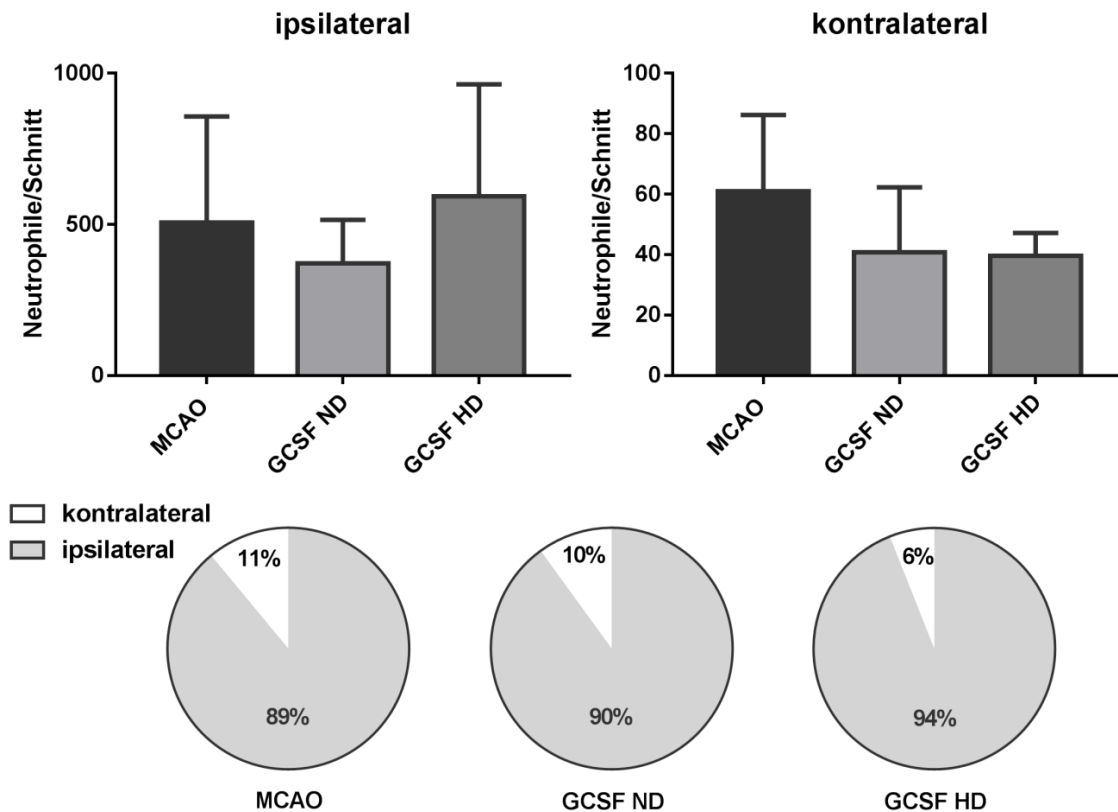


Abbildung 23: Anzahl neutrophiler Granulozyten in der ischämischen und kontralateralen Hirnhälfte. Dargestellt ist die durch quantitative Immunfluoreszenz ermittelte Anzahl neutrophiler Granulozyten der betroffenen Hemisphäre 24 Stunden nach tMCAO als Mittelwert drei repräsentativer Schnitte mit einfacher Standardabweichung. Die Gesamtzahl ausgezählter neutrophiler Granulozyten war in allen drei Versuchsgruppen vergleichbar. Die ischämische Hemisphäre wurde ca. zehnmal häufiger durch neutrophile Granulozyten infiltriert als die kontralaterale Hirnhälfte. $n = 3$ biologische Replikate pro Gruppe. Verglichen wurden MCAO vs. GCSF ND, MCAO vs. GCSF HD und GCSF ND vs. GCSF HD mittels einfaktorierter Varianzanalyse.

In mit G-CSF-behandelten Mäusen unterschied sich die Gesamtanzahl eingewanderter neutrophiler Granulozyten nicht von der der unbehandelten Vergleichsgruppe MCAO. Auch zwischen den G-CSF-Therapiegruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 23). Wie erwartet, war der überwiegende Teil der ausgezählten neutrophilen Granulozyten in der ischämischen Hemisphäre nachweisbar. Kontralateral konnte im Mittel ein Zehntel der Zahl an neutrophilen Granulozyten ausgezählt werden. Hier waren tendenziell weniger neutrophile Granulozyten in den Therapiegruppen nachweisbar ($p = 0,1123$ im Vergleich MCAO zu Hochdosistherapie, $p = 0,1261$ im Vergleich MCAO zu Niedrigdosistherapie), wobei dies ein Effekt der unterschiedlich hohen Standardabweichung sein könnte. Insgesamt waren im

Vergleich zur Durchflusszytometrie deutlich geringere Zellzahlen nachweisbar. Dies liegt in den methodischen Differenzen begründet. Während in der Durchflusszytometrie die gesamte Hirnhälfte analysiert wurde, erfolgte die immunhistochemische Bewertung an drei repräsentativen Koronarschnitten.

4.2.2.2 Meningeal / intrazerebral

Um die Verteilung der neutrophilen Granulozyten im ischämischen Gehirn zu untersuchen, wurden die markierten Gr1-positiven Zellen in einem zweiten Schritt anhand ihrer Lokalisation in intraparenchymatöse und meningeale Granulozyten unterschieden. In allen Versuchsgruppen lag der Großteil der ausgezählten neutrophilen Granulozyten mit im Mittel 75 % im Hirnparenchym selbst. Ein Viertel der ausgezählten Gr1-positiven neutrophilen Granulozyten befand sich in den Meningen (Abbildung 24). Die Therapie mit G-CSF, auch in hoher Dosierung, hatte keinen Einfluss auf die Verteilung neutrophiler Granulozyten in der ischämischen Hirnhälfte. Auch auf der kontralateralen Hemisphäre ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Hier lag der Anteil in den Hirnhäuten gelegener Neutrophiler nochmals niedriger mit im Mittel unter 10 % (Abbildung 24).

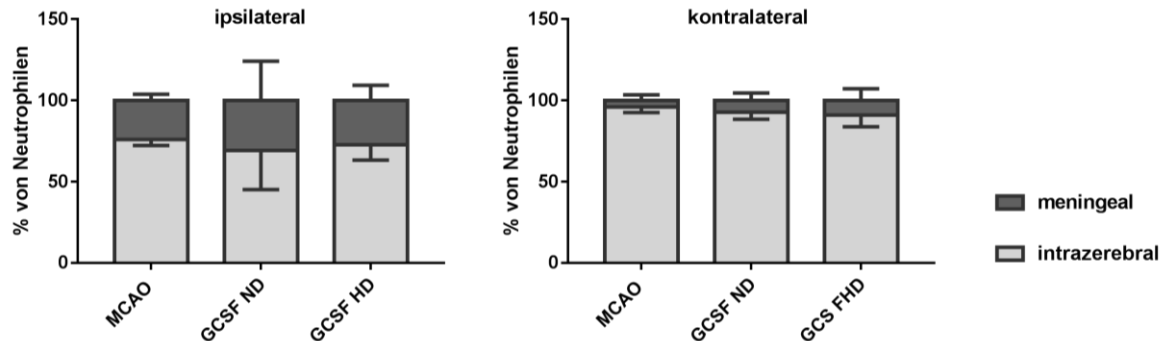


Abbildung 24: Verteilung neutrophiler Granulozyten in der ischämischen und kontralateralen Hirnhälfte. 24 Stunden nach Schlaganfall wurden auf drei repräsentativen Koronarschnitten neutrophile Granulozyten ausgezählt und anhand ihrer Lokalisation in intrazerebral oder meningeal unterschieden. In allen Versuchsgruppen lag der Großteil der Gr1-positiven Granulozyten im Hirnparenchym selbst. Ca. 25 % der ausgezählten Zellen waren in der ischämischen Hemisphäre in den Hirnhäuten (meningeal) lokalisiert. Auf der kontralateralen Hemisphäre war der Anteil intrazerebral gelegener Granulozyten mit ca. 90 % sogar noch höher. Die Behandlung mit G-CSF hatte, gleich welcher Dosierung, keinen Einfluss auf die Verteilung der Granulozyten. Die Daten werden für $n = 3$ als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und wurden mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse beurteilt. Der Vergleich erfolgte zwischen MCAO vs. GCSF ND, MCAO vs. GCSF HD und GCSF ND vs. GCSF HD.

4.2.2.3 Rund / stäbchenförmig

Eine weitere Differenzierung der gefärbten Neutrophilen war anhand ihrer Zellmorphologie möglich, die sich mit dem Prozess der Transmigration über die Bluthirnschranke verändert. Während haftende neutrophile Granulozyten zu Beginn der Extravasation eine runde Gestalt aufweisen, führt die anschließende feste Bindung (Adhäsion) über Integrine zu einer länglichen (stäbchenförmigen) Veränderung der Zellform. Ins Parenchym transmigrierte Leukozyten nehmen wieder eine runde Zellmorphologie an (Audoy-Rémus et al., 2008; Roy et al., 2012). Wie in Abbildung 25 dargestellt, hatte der Großteil der ausgezählten Gr1-positiven Zellen eine runde Zellform. Ca. ein Fünftel der neutrophilen Granulozyten zeigte eine stäbchenförmige Zellmorphologie. Die Therapie mit G-CSF hatte auf die Morphologie der Granulozyten keinen relevanten Einfluss. In der kontralateralen Hemisphäre war, bei deutlich geringerer Gesamtzahl, ein sehr viel höherer Anteil stäbchenförmiger Granulozyten nachweisbar. Signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten Schlaganfallmäusen und jenen mit G-CSF-Therapie fanden sich auch hier nicht.

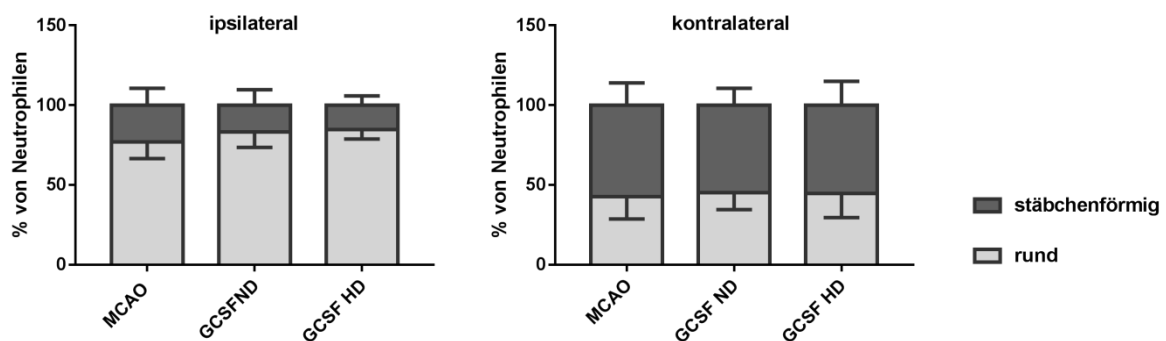


Abbildung 25: Zellform neutrophiler Granulozyten in der ischämischen und kontralateralen Hirnhälfte. Gr1-positive Zellen wurden anhand der Zellmorphologie in rund oder stäbchenförmig unterschieden. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellform in drei repräsentativen Schnitten der betroffenen Hemisphäre 24 Stunden nach tMCAO. In allen Versuchsgruppen wurden runde Granulozyten in der ischämischen Hemisphäre ca. fünfmal häufiger gezählt als solche mit stäbchenförmiger Zellmorphologie. Kontralateral ergab sich ein sehr viel höherer Anteil stäbchenförmiger Zellen. Die Behandlung mit G-CSF hatte, gleich welcher Dosierung, keinen Einfluss auf die Zellmorphologie der Granulozyten. Die Daten sind als Mittelwert mit einfacher Standardabweichung für die Gruppen MCAO (n = 3), Niedrigdosis- (n = 3) und Hochdosis-G-CSF-Therapie (n = 3) dargestellt. Mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse wurden MCAO vs. GCSF ND, MCAO vs. GCSF HD und GCSF ND vs. GCSF HD verglichen.

Um eventuelle Einflüsse der G-CSF-Therapie auf die Verteilung runder beziehungsweise stäbchenförmiger neutrophiler Granulozyten aufzudecken, wurde eine Analyse der Zellform in den beiden Kompartimenten Hirnparenchym und Meningen vorgenommen. Im Mittel waren stäbchenförmige Zellen zu 20 % in den Hirnhäuten und zu 80 % im Hirngewebe zu finden, wohingegen runde neutrophile Granulozyten eine

Verteilung von 30 % zu 70 % zeigten. Die Therapie mit G-CSF in hoher oder niedriger Dosierung bedingte keine relevante Umverteilung (Abbildung 26). Die kontralaterale Hirnhälfte wurde nicht abgebildet, da anhand der geringen Zellzahl in den Meningeal eine Unterscheidung nicht sinnvoll war. Bis auf einzelne Ausnahmen befanden sich stäbchenförmige Zellen im Hirngewebe ohne dass die Verabreichung von G-CSF, egal welcher Dosierung, einen Einfluss hatte.

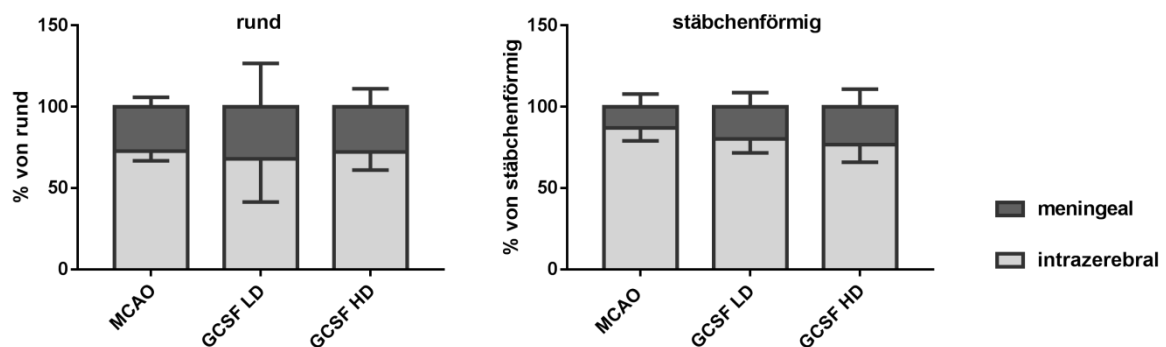


Abbildung 26: Vergleich der prozentualen Verteilung der Lokalisation runder und stäbchenförmiger Granulozyten in der ischämischen Hirnhälfte. Die Grafik veranschaulicht die prozentuale Verteilung der Zellform neutrophiler Granulozyten in den beiden Lokalisationen intrazerebral und meningeal. Insgesamt befanden sich 80 % der Stäbchen intrazerebral, wohingegen runde Zellen hier zu 70 % lokalisiert waren. Die Verteilung war für alle untersuchten Gruppen gleich und demnach unabhängig von der Therapie mit G-CSF, egal welcher Dosierung. Es werden Mittelwerte mit einfacher Standardabweichung für drei biologische Replikate pro Experimentalgruppe abgebildet. Der Vergleich fand durch eine einfaktorische Varianzanalyse zwischen MCAO vs. GCSF ND, MCAO vs. GCSF HD und GCSF ND vs. GCSF HD statt.

4.2.3 Räumliche Verteilung der neutrophilen Granulozyten

Im letzten Schritt wurde der Abstand neutrophiler Granulozyten auf der infarzierten Hemisphäre für die Versuchsgruppen MCAO, Niedrigdosis- und Hochdosistherapie festgestellt. Mithilfe der Nearest-Neighbor-Analyse wurden dabei 5 verschiedene Abstandsintervalle von minimal (< 5 Bildpunkte) bis weit auseinander liegend (≥ 25 Bildpunkte) gebildet. Vergleicht man die räumliche Verteilung der neutrophilen Granulozyten in der ischämischen Hirnhälfte, galt für alle Versuchsgruppen, dass nächste Nachbarn bei ca. 50 % der ausgezählten Zellen den geringsten Abstand von < 5 Bildpunkten aufwiesen. Die zahlenmäßig deutlich geringer vorhandenen stäbchenförmigen Granulozyten lagen in größeren Abständen auseinander. Die meisten, im Mittel 44 %, befanden sich in Abständen größer oder gleich 25 Bildpunkten voneinander entfernt. Runde neutrophile Granulozyten gruppieren sich deutlich stärker und wiesen einen Anteil von 56 % in der niedrigsten Abstandsklasse auf (Abbildung 27).

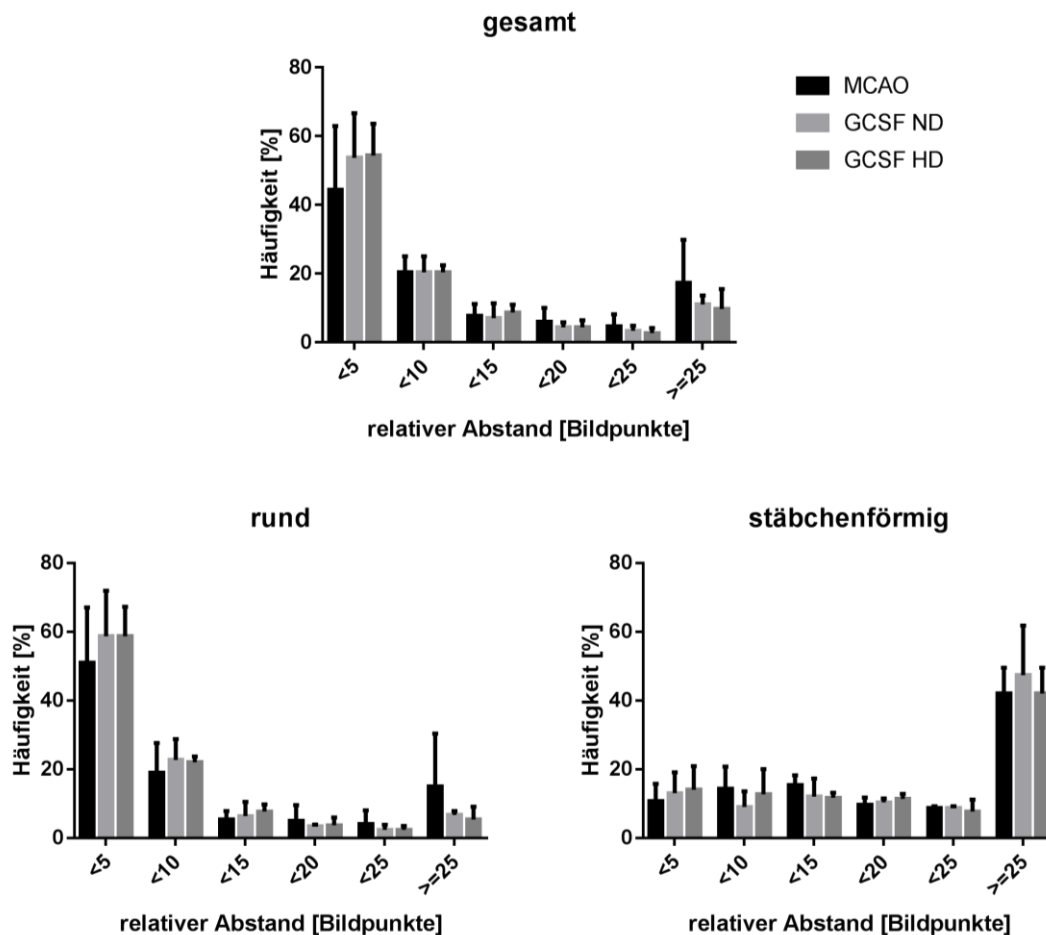


Abbildung 27: Räumliche Verteilung neutrophiler Granulozyten auf der ischämischen Hirnhälfte. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der ausgezählten Granulozyten zu definierten Abstandsintervallen in der ipsilateralen Hemisphäre, die mittels Nearest-Neighbor-Analyse ermittelt wurden. In der infarzierten Hirnhälfte lagen die Gr1-positiven Zellen erwartungsgemäß dicht nebeneinander. In allen Versuchsgruppen wiesen ca. 50 % der ausgezählten Zellen nächste Nachbarn im Abstand von < 5 Bildpunkten auf. Runde Zellen wiesen eine ähnliche Verteilung auf, während die zahlenmäßig geringeren stäbchenförmigen Granulozyten großzügiger streuten, sodass in der größten Abstandsklasse die meisten Zellen zu finden waren. Für keine der experimentellen Gruppen ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Subanalyse. Die Daten werden für $n = 3$ als Mittelwert \pm Standardabweichung 24 Stunden nach Schlaganfall dargestellt. Es wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse Gruppenvergleiche zwischen MCAO vs. GCSF LD, MCAO vs. GCSF HD und GCSF LD vs. GCSF HD vorgenommen.

Abbildung 28 verdeutlicht durch Voronoi-Diagramme die Nachbarschaftsverhältnisse der neutrophilen Granulozyten. Je kleiner die Flächen sind, desto dunkler imponiert der Bereich und desto enger liegen die Zellen beieinander. Die räumliche Verteilung war in allen Gruppen gleichartig. Die meisten eingewanderten neutrophilen Granulozyten fanden sich dabei ventrolateral im temporoparietalen Kortex, und damit in der Randzone des Infarktes in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Hirnhäuten. Hierbei wurden insbesondere das olfaktorische System sowie der primäre und sekundäre somatosensorische Kortex aber auch in geringerem Maße die Inselregion und Kerngebiete des Hypothalamus wie die präoptische Region und des mesolimbischen Systems.

schen Systems besiedelt. Im Bereich der Basalganglien, also dem Infarktkern, der bereits nach 30-minütiger Okklusion infarziert ist, waren wenige neutrophile Granulozyten zu finden (Carmichael et al., 2005) (Abbildung 29). Eine ähnliche räumliche Verteilung neutrophiler Granulozyten wurde kürzlich mittels Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Imaging (erstmalig für dieses Modell) und Zwei-Photonen-Mikroskopie nachgewiesen (Hasenberg et al., 2015; Vaas et al., 2017). Sie könnte darauf hinweisen, dass neutrophile Granulozyten primär über leptomenigeale Gefäße in das ischämische Gehirn migrieren.

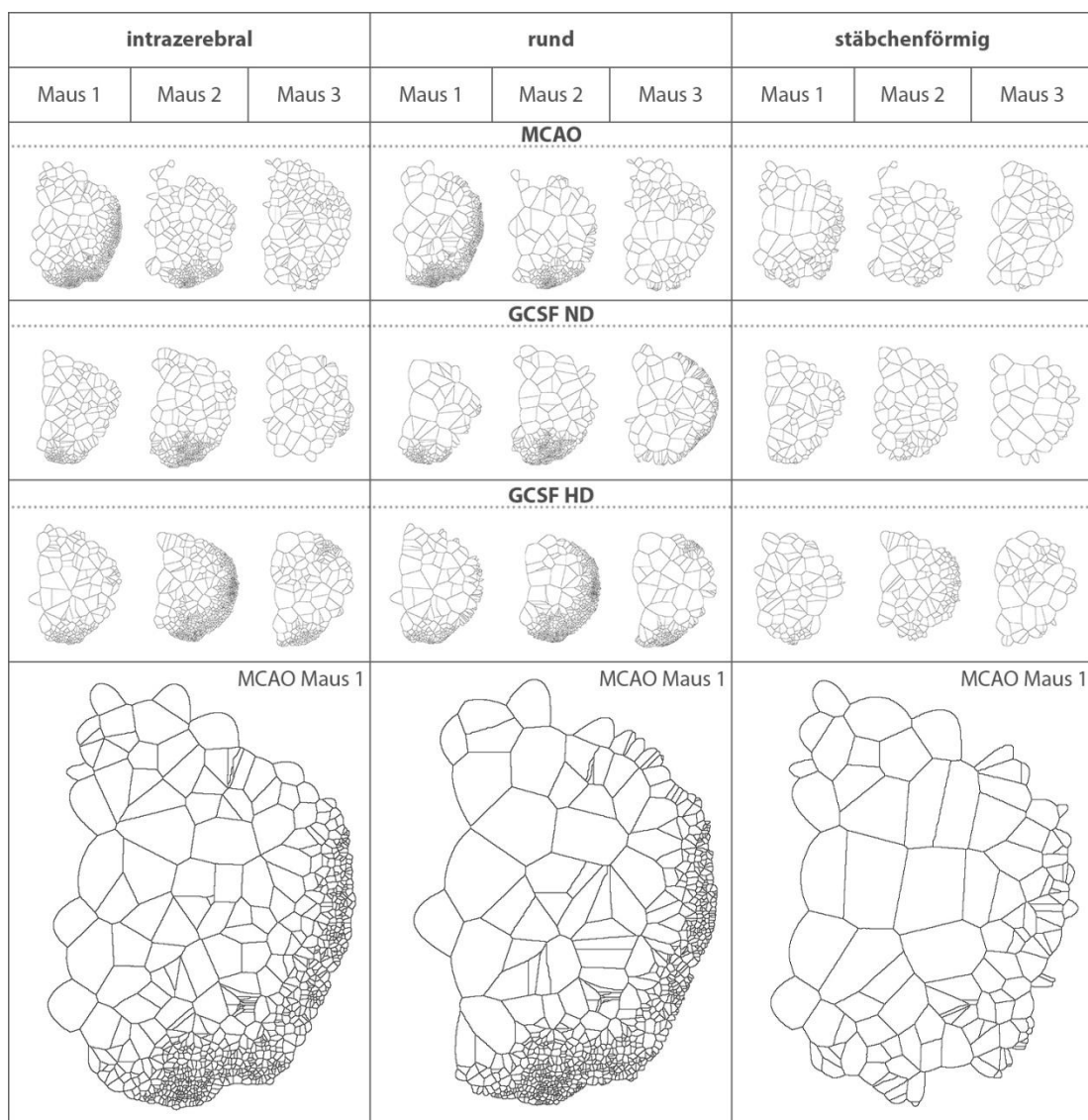


Abbildung 28: Voronoi-Diagramme der ischämischen Hirnhälfte. Dargestellt werden ausgewählte Voronoi-Diagramme zur Veranschaulichung der räumlichen Verteilung neutrophiler Granulozyten in der ischämischen Hemisphäre 24 Stunden nach Schlaganfall. Die Verteilung der Zellen war in allen Gruppen gleichartig. Die meisten hirninfiltrierenden neutrophilen Granulozyten clusterten in ventrolateraler kortikaler Region nahe der Meningen und zeigten eine runde Erscheinungsform. Eine meningeale Infiltration war in ähnlicher Lokalisation zu finden (nicht dargestellt). Stäbchenförmige Zellen verteilten sich gleichförmiger und wiesen nur eine geringe Ballungstendenz in diesem Hirnareal auf.

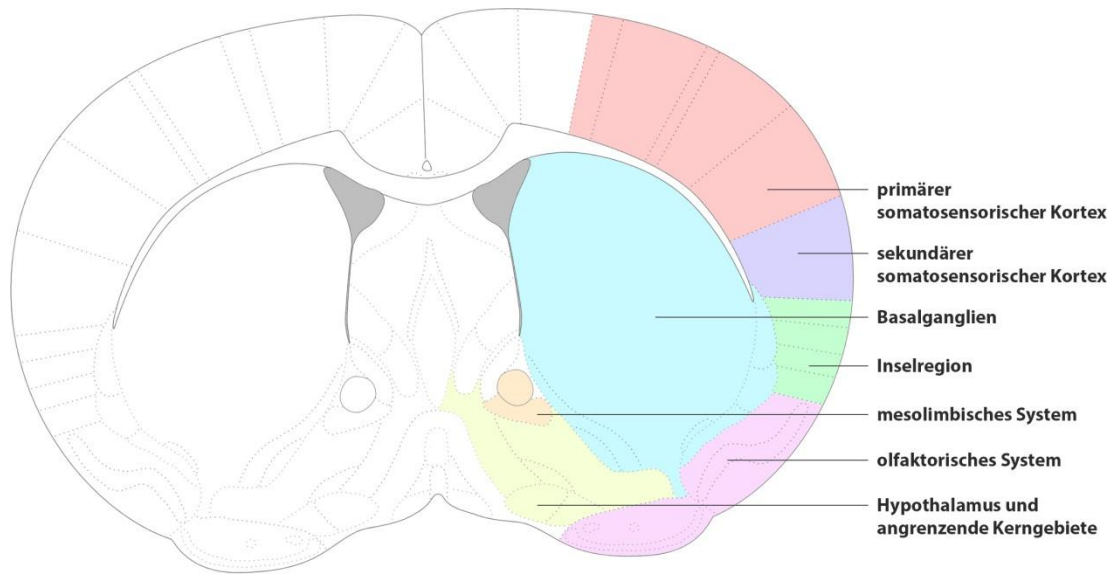


Abbildung 29: Anatomische Strukturen im Koronarschnitt. Um die Lokalisation neutrophiler Granulozyten im Voronoi-Diagramm den anatomischen Strukturen zuordnen zu können, werden diese in einem Koronarschnitt von Bregma +0,5 aufgeführt.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der ischämische Schlaganfall löst eine massive Entzündungsreaktion aus, die den Gewebeschaden verstärkt, aber auch an späteren Reparaturprozessen beteiligt ist. Zu Beginn der ischämischen Schadenskaskade führt der Untergang von Neuronen im Infarktgebiet zur Freisetzung sogenannter schadensassoziiertes Moleküle (DAMPs), die Mikroglia und perivaskuläre Makrophagen aktivieren. Durch die Freisetzung entzündungsfördernder Mediatoren wie TNF- α und IL-1 β kommt es zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf den zerebralen Endothelzellen. Aus verschiedenen experimentellen Schlaganfallstudien ist bekannt, dass es innerhalb von Stunden nach dem Ereignis zu einer fein abgestimmten Einwanderung von Leukozyten in das Infarktgebiet kommt (Kostulas et al., 1998; Dimitrijevic et al., 2007; Yilmaz et al., 2008; Gelderblom et al., 2009; Möller et al., 2014). Dabei gehören neutrophile Granulozyten als Teil der angeborenen Immunantwort zu den Zellen, die als erste in das ischämische Gehirn infiltrieren. Sie erreichen ihr Maximum ca. 24 Stunden nach dem Schlaganfall und werden in der Folge von Monozyten und Makrophagen abgelöst (Barone et al., 1995; Ballesteros et al., 2014). Neutrophile Granulozyten wurden in zahlreichen experimentellen Studien mit einer Zunahme des Infarktolumens und einem schlechteren funktionellen Outcome durch Schädigung des Parenchyms, der Blut-Hirn-Schranke und Ödembildung in Verbindung gebracht (Akopov et al., 1996; Müller et al., 2008). Hierfür wurde die Freisetzung von Enzymen wie der Matrix-Metalloproteinase und Neutrophilen Elastase, proinflammatorischen Zytokinen sowie reaktiven Sauerstoffspezies (Gidday et al., 2005; Ikegame et al., 2010) verantwortlich gemacht. Auch wurde der Begriff der Thromboinflammation geprägt, der die Verstärkung des ischämischen Traumas durch verminderte Reperfusion aufgrund akkumulierender neutrophiler Granulozyten und Thrombozyten beschreibt (Nieswandt et al., 2011). Zu einer Potenzierung der Thrombusbildung führen freigesetzte prothrombotische Faktoren und extrazelluläre Netze mit anhaftenden Enzymen (NETs), die durch sterbende neutrophile Granulozyten gebildet werden. (Darbousset et al., 2012; De Meyer et al., 2016).

Der Wachstumsfaktor G-CSF wurde in den 2000er Jahren in einer Vielzahl präklinischer Studien erfolgreich zur Behandlung des ischämischen Schlaganfalls eingesetzt (siehe Review England et al., 2009; Minnerup et al., 2008). Als primäre Wirkmechanismen sind die Induktion antiapoptotischer Signalwege sowie positive Effekte auf Neuro- und Angiogenese beschrieben. Dabei wird die Apoptose geschädigter

Zellen, insbesondere von Neuronen, über die Ansteuerung verschiedener Signalkaskaden, die zur Transkription von Wachstumsfaktoren und Zytokinen führen, gehemmt. Durch Proliferation, Differenzierung und selektives Fortbestehen neuronaler Progenitorzellen wird zudem die Zelldichte von Neuronen erhöht (Schneider et al., 2005). Die Aussprossung neuer Gefäße und Kollateralisierung bereits vorhandener unterstützt letztlich die regenerativen Prozesse über die Anbindung ans Gefäßsystem (Duelsner et al., 2012). Trotz seiner vielfältigen Effekte auf das Immunsystem existieren überraschenderweise wenige Arbeiten zum Einfluss von G-CSF auf die postischämische Entzündungsreaktion. So führt G-CSF neben der primären Mobilisation und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zu einer Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark. Weiter nimmt G-CSF Einfluss auf die Anzahl und Funktion von Monozyten/Makrophagen und die Ausprägung der Immuntoleranz durch Verschiebung der T-Zellsubtypen, dendritischen Zellen und Zytokinproduktion (Rutella et al., 2007; Garcia et al., 2014).

Aufgrund der ermutigenden experimentellen Daten wurde G-CSF 2013 in einer randomisierten kontrollierten klinischen Phase-IIa-Studie zur Behandlung des Schlaganfalls eingesetzt. Leider wurden weder der primäre Endpunkt mit Abbildung des Behinderungsgrads nach 90 Tagen in Form der modifizierten Ranking Skala (mRS) noch der sekundäre Endpunkt mit Berechnung des NIHSS als Äquivalent des klinischen Outcome nach 90 Tagen erreicht (Ringelstein et al., 2013). Tatsächlich konnte nach reziproker Dosistranslation in den Mausorganismus gezeigt werden, dass in der genannten klinischen Studie eine sehr viel höhere G-CSF-Dosis als in den erfolgreichen tierexperimentellen Studien eingesetzt wurde. Deshalb stellte sich die Frage, ob nachteilige immunologische Effekte des G-CSF zur gescheiterten Translation beigetragen haben könnten. Ein Hinweis hierauf könnte sein, dass in der Therapiegruppe der AX200-Studie mit Granulo- und Monozytose, einer signifikant erhöhten Körpertemperatur und einem erhöhten C-reaktiven Protein systemische Wirkungen des G-CSF nachweisbar waren. Da G-CSF wie oben beschrieben auf vielfältige Weise Einfluss auf das Immunsystem nimmt, wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob und inwieweit G-CSF dosisabhängig zu einer verstärkten Einwanderung neutrophiler Granulozyten oder anderer Entzündungszellen in das ischämische Gehirn geführt haben könnte. Zu diesem Zweck wurde in C57BL/6-Mäusen ein experimenteller Schlaganfall ausgelöst und das Entzündungsinfiltrat im Gehirn nach 24 Stunden mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie untersucht. Die beiden Therapiegruppen (G-CSF in niedriger und hoher Dosierung) wurden mit Kontrolltieren verglichen, denen statt G-CSF die Trägersubstanz verabreicht wurde (MCAO)

und mit Mäusen, die einer Scheinoperation ohne Auslösung eines Schlaganfalls, unterzogen wurden. Als Referenzwert dienten Analysen von naiven Mäusen.

5.2 G-CSF und die Einwanderung neutrophiler Granulozyten

Die vorliegende Arbeit konnte mittels durchflusszytometrischer Analyse nachweisen, dass die hochdosierte Therapie mit G-CSF 24 Stunden nach Schlaganfall nicht in einer vermehrten Infiltration neutrophiler Granulozyten in die ischämische Hirnhälfte resultiert. Zwar führte der Schlaganfall selbst zu einer sterilen Entzündungsreaktion mit massiver Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, wobei fünfmal mehr als in scheinoperierten Mäusen ohne Infarkt zu finden waren. Dieser Effekt wurde durch die Hochdosis-Behandlung mit G-CSF aber nicht verstärkt. Ebenso wenig hatte die niedrige G-CSF-Dosis einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl eingewanderter Granulozyten. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse wurden durch aufwendige immunhistochemische Untersuchungen bestätigt. Beim Vergleich der beiden Hemisphären konnten ca. zehnmal mehr Granulozyten in der ischämischen Hirnhälfte gezählt werden. Diese Asymmetrie ist hinreichend bekannt und wurde unter anderem durch Morrison (2011), Enzmann (2013) sowie Perez-de-Puig (2015) und Kollegen beschrieben. G-CSF beeinflusste neutrophile Granulozyten nicht zahlenmäßig, doch inwieweit möglicherweise ihre Effektorfunktionen verändert wurden, war nicht Teil der vorliegenden Arbeit. Tatsächlich gibt es Studien, die gezeigt haben, dass G-CSF den „oxidative Burst“ und die Phagozytosekapazität von Granulozyten verstärkt (Roilides et al., 1992; Carulli et al., 1995; Jaeger et al., 1999). Ebenso stimuliert die Gabe von G-CSF die Bildung von NETs. Bereits eine einzige Dosis reicht aus, um eine gesteigerte Formierung von NETs zu bewirken, die bei täglicher Applikation nochmals potenziert wird. Eine kongruente Steigerung thrombotischer Ereignisse wurde nicht beobachtet, wobei nicht ausgeschlossen wurde, dass dies unter bestimmten Bedingungen möglich ist (Schoergenhofer et al., 2017). Zum Beispiel wies eine Arbeit nach, dass durch Tumorzellen produziertes G-CSF ursächlich für die prothrombogenen Eigenschaften des Blutes von Krebspatienten ist (Demers et al., 2012). Um diesbezüglich Aufschluss zu erhalten, wären funktionelle Analysen zur Aktivität der Myeloperoxidase bzw. die Anfärbung von NETs hilfreich wie es in der Studie von Perez-de-Puig und Kollegen vorgenommen wurde. Sie zeigten, dass ca. 15 % bis 20 % der Neutrophilen Hinweise auf die Formierung von NETs lieferten und somit potentiell umliegendes Gewebe zerstören könnten.

5.3 G-CSF und die Zusammensetzung des frühen entzündlichen Infiltrats im Gehirn

Durch die hochdosierte Behandlung mit G-CSF kam es zu einer signifikanten Zunahme CD45-hochpositiver Leukozyten in der ischämischen Hirnhälfte, und zwar sowohl im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren als auch im Vergleich zur niedrigen G-CSF-Dosis. Wie oben bereits erwähnt, waren neutrophile Granulozyten nicht für diese Differenz verantwortlich. Stattdessen zeigte sich in der Hochdosisgruppe ein massiver Anstieg von Makrophagen, inflammatorischen Monozyten sowie einer Ly6C/MHC-II-positiven Mischpopulation, die wahrscheinlich Monozyten im Übergang zu Makrophagen und dendritische Zellen umfasst (Wagner et al., 2014). Neben dem monozytären Marker Ly6C exprimierten sie zusätzlich MHCII. Letzterer weist auf die Ausbildung phagozytierender und antigenpräsentierender Eigenschaften hin und wird vor allem bei proinflammatorisch ausgerichteten Makrophagen sowie klassischen dendritischen Zellen vorgefunden, die über T-Zellregulierung Einfluss auf das angeborene Immunsystem nehmen (Merad et al., 2013; Kim et al., 2016).

Auffällig war, dass die F4/80-positive Makrophagenpopulation bereits zu diesem frühen Zeitpunkt die zahlenmäßig stärkste Population im Gehirn darstellte. Da nicht nur Makrophagen sondern auch aktivierte Mikrogliazellen F4/80 exprimieren, kann dieser Umstand auf eine zusätzliche Detektion jener Mikrogliapopulation zurückzuführen sein. Mikrogliazellen und perivaskuläre Makrophagen sind die ersten Immunzellen, die auf den Entzündungsreiz durch Ischämie reagieren (Schilling et al., 2003; Neumann et al., 2008; Iadecola et al., 2011). Generell ist die Unterscheidung von Makrophagen und aktivierten Mikrogliazellen anhand der Oberflächenantigene nur eingeschränkt möglich, weil beide Zelltypen aufgrund ihrer ähnlichen Funktion ein hochkongruentes Antigenmuster aufweisen (Patel et al., 2013). Eine eindeutige Zuordnung gelingt nur über aufwendige Analysen der genetischen Signatur wie z. B. für Transkriptionsfaktoren oder über Verfolgung der Migration markierter Knochenmarkstransplantate sowie peripherer Phagozyten (Ginhoux et al., 2003; Rausch et al., 2001). Vergleichbare Ergebnisse wie in der vorliegenden Studie lieferte die Arbeitsgruppe um Gelderblom, die allerdings ohne G-CSF-Therapie eine frühe Aktivierung von Mikrogliazellen und in geringerem Maße Makrophagen (nach 12 bis 24 Stunden) im ischämischen Hirn vorfand (Gelderblom et al., 2009). Andere Arbeiten propagieren eine spätere Ausbildung von monozytären Makrophagen (Barone et al., 1995; Schilling et al., 2003; Breckwoldt et al., 2008).

Unklar ist, auf welche Weise die Behandlung mit G-CSF zu einer verstärkten Rekrutierung von Ly6C-positiven Monozyten in das ischämische Gehirn führt. Eine Monozytose, wie in der AX200-Studie, fand sich in der vorliegenden Arbeit bis 24 Stunden nach Schlaganfall nicht (siehe unten). In-vitro-Experimente haben gezeigt, dass G-CSF zu einer verstärkten Adhäsionsmolekülexpression auf Endothelzellen führt, und damit die Adhäsion von Leukozyten fördert (Fusté et al., 2004). Ob G-CSF auch die Adhäsionsmolekülexpression auf zirkulierenden Immunzellen moduliert, wie für GM-CSF beschrieben (Novella et al., 1997), ist unbekannt und könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen, auch im Schlaganfallmodell, sein. Eine weiterführende Studie unserer Arbeitsgruppe konnte keine gesteigerte Genexpression von relevanten Chemokinen und inflammatorischen Zytokinen durch G-CSF feststellen, die zu einer verstärkten Rekrutierung führen würde (Wagner et al., 2014).

Welchen Einfluss die verstärkte Einwanderung von Monozyten/Makrophagen unter der Hochdosisbehandlung mit G-CSF auf den postischämischen Entzündungsprozess nimmt, bleibt mit der vorliegenden Arbeit ebenso unbeantwortet. Inflammatorischen Monozyten wurden in einigen experimentellen Studien zum ischämischen und hämorrhagischen Infarkt sowie Myokardinfarkt nachteilige Effekte zugeschrieben, u. a. über die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α (Dimitrijevic et al., 2007; Nahrendorf et al., 2007; Taguchi et al., 2007; Schilling et al., 2009; Hammond et al., 2014). Die Arbeitsgruppe um Gliem (2012) zeigte dagegen, dass sie zum Erhalt der neurovaskulären Integrität beitragen und damit Einblutungen in das Infarktgebiet verhindern. In einer Studie von Wattananit (2016) wurde auf die Bedeutung von Ly6C-positiven Monozyten für die langfristige funktionelle Erholung nach einem Schlaganfall hingewiesen. Ein Erklärungsmodell liefern weitere kürzlich erschienene Arbeiten, die postulieren, dass inflammatorische Monozyten mit ein- bis zweiwöchiger Latenz im Infarktgebiet in Ly6C-niedrigpositive/-negative Monozyten differenzieren, die eine wichtige Rolle für die Entwicklung von antiinflammatorischen M2-Makrophagen spielen (Gliem et al., 2012; Chu et al., 2014; Miró-Mur et al., 2016). Diese wirken durch Ausschüttung von TGF- β und IL-10 sowie Phagozytose von Zelldebris antiinflammatorisch (Hu et al., 2012) und fördern die Axonaussprossung durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren. Genauso wie neutrophile Granulozyten scheinen inflammatorische Monozyten über die meningealen Gefäße anzufutern (Miró-Mur et al., 2016). Hier sind weiterführende Arbeiten erforderlich, die neben mechanistischen Untersuchungen neurologische Endpunkte wie das Infarktvolumen und die funktionelle Erholung zu einem späteren Zeitpunkt einbeziehen, wie es Wattananit (2016) bereits aufzeigt.

Interessanterweise führte die hochdosierte Therapie mit G-CSF zu einer verstärkten Rekrutierung von T-Lymphozyten in das ischämische Gehirn. Da die Differenzierung der T-Lymphozytensubpopulationen abseits des eigentlichen Fokus der Arbeit lag, wurden keine weiteren Differenzierungen anhand von Oberflächenmarkern vorgenommen. Pathophysiologisch sind T-Zellen in der Frühphase des Schlaganfalls für eine Reihe Antigen-unabhängiger schädlicher Effekte verantwortlich. So tragen regulatorische T-Zellen durch erhöhte Interaktion mit Endothelzellen und Thrombozyten zum Unterhalt der Thromboinflammation bei, woraus eine Mikrozirkulationsstörung im Ischämiegebiet resultiert. Erst nach etwa einer Woche wird der Wechsel zum antiinflammatorischen Phänotyp vollzogen, der überwiegend IL-10 und TGF- β abhängig agiert (Liesz et al., 2009; Kleinschnitz et al., 2013). Eine Arbeit wies den Einfluss von NK-T-Zellen auf den neuronalen Zelluntergang durch direkte zytotoxische Effekte, erhöhte neuronale Erregbarkeit mit resultierendem gesteigerten Sauerstoffbedarf und Verstärkung der lokalen Entzündungsreaktion nach (Gan et al., 2014). Bekannter noch ist die Auswirkung von IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen auf die lokale Entzündungsreaktion. Aktiviert durch DAMPs und makrophagensekretiertes IL-23, führt die Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-17 zur Bildung von Matrix-Metalloproteinasen, die mit dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke assoziiert sind. Außerdem wurde als schädigender Mechanismus die vermehrte Produktion von CXCL-1 in Astrozyten angeführt, das wiederum neutrophile Granulozyten rekrutiert (Shichita et al., 2009; Gelderbloom et al., 2012). In der subakuten Phase werden insbesondere CD4- und CD8-positive T-Lymphozyten antigenabhängig aktiviert. B-Lymphozyten scheinen eher keine Rolle zu spielen (Yilmaz et al., 2006).

5.4 G-CSF und die räumliche Verteilung einwandernder neutrophiler Granulozyten

Der zeitliche Ablauf der Immunzellinfiltration nach einem Schlaganfall wurde in zahlreichen experimentellen Studien beschrieben (Kostulas et al., 1998; Dimitrijevic et al., 2007; Yilmaz et al., 2008). Wenige Erkenntnisse gibt es dagegen zur räumlichen Organisation der Entzündungsreaktion. In der vorliegenden Arbeit gaben die immunhistochemischen Analysen, über die reine Quantifizierung hinaus, Aufschluss über die räumliche Verteilung der eingewanderten neutrophilen Granulozyten. Hierbei zeigte sich, dass der Großteil der Granulozyten auf der ischämischen Hemisphäre im temporoparietalen Kortex, in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Hirnhäuten lokalisiert war. Ca. 25 % der ausgezählten Zellen lagen in den Leptomeningen selbst.

Auf der nicht infarzierten Hirnhälfte befanden sich deutlich mehr neutrophile Granulozyten intrazerebral, sodass lediglich 10 % in den Meningen auszumachen waren. Diese Verteilung lässt Rückschlüsse auf den mutmaßlichen Rekrutierungsweg der Granulozyten zu. So ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, dem Tiermodell der Multiplen Sklerose, primär über das Gefäßsystem der Meningen anfluten (Christy et al., 2012; Sayed et al., 2010). Dabei fungieren ortsständige Mastzellen über die Produktion von TNF- α als Initiatoren der frühen Neutrophileninvasion. Auch im Schlaganfall könnte dieser Mechanismus Gültigkeit haben. In den letzten Jahren wurde diesbezüglich intensiv geforscht. Bliss und Kollegen wiesen 2014 nach, dass meningeale Mastzellen unter anderem über IL-6 entscheidend zu den zentralen Mechanismen in der Schlaganfallpathologie beitragen, wobei neben der Steigerung der Neutrophilenmigration die Ausbildung eines Hirnödems und das Infarktwachstum negativ beeinflusst werden (Arac et al., 2014). Auf der kontralateralen Hemisphäre findet dieser Rekrutierungsmechanismus nicht statt.

Ein ähnliches Verteilungsmuster der Granulozyten wie in der vorliegenden Arbeit wurde bereits im permanenten Schlaganfallmodell der Ratte (Möller et al., 2014) und Maus (Perez-de-Puig et al., 2015) beschrieben. Für die Okklusion der distalen A. cerebri media ist in diesen Modellen aber eine offene Kraniotomie erforderlich. Hierdurch kommt es zu einer Verletzung der Hirnhäute, die die lokale Akkumulation von neutrophilen Granulozyten zusätzlich erklären kann. Enzmann und Kollegen (2012) beobachteten jedoch auch im transienten Schlaganfallmodell der Maus eine Ansammlung neutrophiler Granulozyten in den Leptomeningen und im umgebenden Kortex. Interessanterweise waren die Zellen in dieser Studie nahezu ausschließlich intravasal bzw. im perivaskulären Raum lokalisiert, eine Beobachtung, die zwischenzeitlich relativiert wurde (Perez-de-Puig et al., 2015; Ullrich et al., 2014). Letztere Arbeit konnte mittels immunhistochemischer Analysen nachweisen, dass 24 Stunden nach Ischämie ca. 60 % der Neutrophilen im Hirnparenchym, allerdings in enger Nachbarschaft zu Gefäßen lokalisiert sind. Diese Verteilung wurde durch die Zugabe von G-CSF nicht verändert (Ullrich et al., 2014). Bei großen Infarkten wäre es allerdings vorstellbar, dass der Zusammenbruch des pialen Anastomosennetzes durch die ausgeprägte Hirnschwellung der Einwanderung von Granulozyten über die Meningen entgegenwirkt (Perez-de-Puig et al., 2015). Aufgrund der gewählten Methoden war die vorliegende Arbeit nicht dazu ausgelegt festzustellen, ob die infiltrierenden neutrophilen Granulozyten auch die Glia limitans überwinden und ins Parenchym einwandern oder ob etwaige parenchymatös gelegene Neutrophile durch

Phagozytose, oxidativen Burst sowie Bildung von NETs auch tatsächlich gewebeschädigend agieren.

Im Bereich der Stammganglien, dem eigentlichen Infarktkern bei der transienten Okklusion der mittleren Hirnarterie, fand sich in der vorliegenden Arbeit nur eine geringe Ansammlung von neutrophilen Granulozyten. Ähnliche Beobachtungen wurden durch andere Arbeitsgruppen gemacht (Enzmann et al., 2012; Perez-de-Puig et al., 2015). Dies erscheint auf den ersten Blick verwunderlich, weil man in diesem am stärksten geschädigten Areal mit einer massiven Freisetzung von DAMPs und in der Folge proinflammatorischen Zytokinen durch untergehende Zellen rechnen würde. Andererseits sterben aufgrund des absoluten Energiemangels auch Mikrogliazellen und perivaskuläre Makrophagen ab, wodurch die Ausschüttung von entzündungsfördernden Interleukinen und Chemokinen mit resultierender Rekrutierung von weiteren Leukozyten verhindert werden könnte. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass die Versorgung dieses Hirnareals in der Regel über Endstromarterien erfolgt, sodass fehlende Kollateralen die Extravasation von Neutrophilen verhindert haben könnten.

Neben den genannten Lokalisationen kam es um den Sehnerv, der selbst nicht im Präparat enthalten war, die präoptische Region und das olfaktorische System zu einer Ansammlung von neutrophilen Granulozyten. Die A. ophthalmica, die den Sehnerv versorgt, wird aus der A. carotis int. gespeist, die durch die Fadenokklusion temporär mit verschlossen ist. Gleichmaßen kann die präoptische Region durch einen indirekten Verschluss lentikulostriatärer Äste der mittleren Hirnarterie in Mitleidenschaft gezogen worden sein. Beide Veränderungen sind für das gewählte Schlaganfallmodell bekannt (Enzmann et al., 2013). Der Wachstumsfaktor G-CSF nahm, unabhängig von seiner Dosierung, keinen Einfluss auf die beschriebene Verteilung neutrophiler Granulozyten in Hirngewebe und Hirnhäuten.

5.5 G-CSF und die Zellmorphologie einwandernder neutrophiler Granulozyten

Darüber hinaus fand eine Bewertung der neutrophilen Granulozyten hinsichtlich ihrer Zellmorphologie statt, wobei runde und stäbchenförmige Granulozyten unterschieden wurden (Audoy-Rémus et al., 2008; Roy et al., 2012). Die Zellform wird in der Literatur mit verschiedenen Stadien der Leukozyteninvasion in Verbindung gebracht. Dabei weist die stäbchenförmige Morphologie auf eine integrinvermittelte Adhäsion der Zelle an die Gefäßwand und eine bevorstehende Diapedese hin (Ehrenguber et al., 1996; Roy et al., 2012; Audoy-Rémus et al., 2008). Sie findet sich zudem bei

proliferierenden Zellen (Roy et al., 2012). Dagegen werden runde Leukozyten mit einem früheren Stadium der Transmigrationskaskade, nämlich dem Anhaften und Rollen in Verbindung gebracht (Ehrengruber et al., 1996; Audoy-Rémus et al., 2008). Vallières und Sawchenko (2003) genauso wie Roy und Kollegen (2012) beschrieben jedoch auch das Vorliegen runder Zellen, im Hirnparenchym selbst, so dass es nach erfolgter Einwanderung erneut zu einem Wandel der Morphologie kommen kann.

In der vorliegenden Arbeit zeichneten sich ca. 80 % der Zellen durch eine runde Morphologie aus, und zwar unabhängig von der erfolgten Behandlung. Sie waren überwiegend im temporoparietalen Kortex der infarzierten Hemisphäre lokalisiert, teilweise auch in den angrenzenden Hirnhäuten. Darüber hinaus wurden Ansammlungen von runden, lose anhaftenden neutrophilen Granulozyten in größeren meningealen und intraparenchymatösen Gefäßen innerhalb des Infarktareals detektiert, die als solche aufgrund der ovalen bis runden Gewebssaussparung identifiziert wurden. Da keine immunhistochemische Anfärbung der Gefäße erfolgte, muss offen bleiben, wie viele runde Granulozyten im Hirnparenchym selbst und wie viele in kleineren intrazerebralen Gefäßen lokalisiert waren.

20 % der Zellen fielen durch eine stäbchenförmige Morphologie auf. Sie sammelten sich weniger im Kortex an und waren im Vergleich zu runden Zellen gleichmäßiger über die Hemisphäre verteilt. Eine denkbare Erklärung ist, dass zum Untersuchungszeitpunkt 24 Stunden nach Ischämie bereits der Großteil neutrophiler Granulozyten in das Hirnparenchym eingewandert ist und damit wieder eine runde Zellform angenommen hat. Vereinzelt wurden auch stabförmige neutrophile Granulozyten mit mehr als zwei Zellpolen (sternförmig) beobachtet. Sie befanden sich möglicherweise innerhalb einer Gefäßabzweigung oder proliferierten (Roy et al., 2012).

Eine Umverteilung beider Zellformen hinsichtlich ihrer Lage in den Hirnhäuten oder im Hirngewebe konnte infolge der Therapie mit G-CSF nicht beobachtet werden. In der MCAO-Gruppe wie auch in den Therapiegruppen waren von beiden Zellformen etwa ein Viertel in den Meningen und drei Viertel im Hirngewebe lokalisiert. Demzufolge konnte in den Meningen nach G-CSF-Gabe keine verstärkte Endothelbindung beobachtet werden, die Ausdruck einer gesteigerten Einwanderung neutrophiler Granulozyten über die Hirnhäute ins Hirngewebe gewesen wäre.

In der gesunden Hirnhälfte war das Verhältnis von stäbchenförmigen und runden neutrophilen Granulozyten ausgeglichen. Zellen mit länglicher Morphologie befan-

den sich fast ausschließlich intrazerebral, wobei es insgesamt nur zu einer geringen Besiedelung der Meningen kam, auch von runden Zellen. Es lässt sich vermuten, dass stäbchenförmige Granulozyten das Gefäßsystem patrouillieren, aber nicht ins Parenchym übergehen. Darüber hinaus kam es weder durch den Schlaganfall noch durch die G-CSF-Therapie zu einer vermehrten Rekrutierung über die Meningen und folglich auch zu keiner gehäuften Ansammlung runder bereits ins Parenchym eingewanderter Granulozyten.

Die Behandlung mit G-CSF veränderte die Morphologie neutrophiler Granulozyten im Gehirn nicht. Es ist folglich unwahrscheinlich, dass er Einfluss auf die Kinetik der Immunzellinfiltration im Schlaganfall nimmt. G-CSF wirkt demnach weder chemotaktisch noch chemokinetisch, wie auch andere Arbeiten aufzeigen konnten (Wengner et al., 2008). Dem entgegen steht die Studie von Chakraborty und Kollegen (2003). Sie diskutierten eine verstärkte Bindung von neutrophilen Granulozyten an Adhäsionsmoleküle durch G-CSF, die jedoch später auftritt als die durch Chemokine induzierte Adhäsion. Durch die relativ gesehen späte Gefäßbindung verzögert sich der Gestaltwechsel von neutrophilen Granulozyten, die daraufhin aufgrund ihrer Größe in den kleinen Kapillaren mechanisch festgehalten werden, sodass nachfolgende Neutrophile akkumulieren (Chakraborty et al., 2003).

5.6 G-CSF und die periphere bzw. systemische Immunantwort

Wie oben ausgeführt, veränderte der Wachstumsfaktor G-CSF die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das ischämische Gehirn 24 Stunden nach Schlaganfall nicht. In ähnlicher Weise führte die Behandlung mit G-CSF, gleich welcher Dosierung, zu keiner signifikanten Granulozytose im peripheren Blut. Zwar zeigte sich in allen Mäusen, die einen Schlaganfall erlitten hatten, eine Verschiebung hin zu neutrophilen Granulozyten (bei naiven Tieren 10 % bis 20 % aller Leukozyten, nach Schlaganfall ca. 50 %), diese war in den G-CSF-Gruppen allerdings nicht signifikant gesteigert. Anders als im Menschen herrscht im Blut gesunder Mäuse ein Verhältnis von 75 % bis 90 % Lymphozyten zu 10 % bis 25 % Neutrophilen (Mestas et al., 2004).

Tatsächlich führt der Schlaganfall allein zu einer erheblichen Mobilisation von neutrophilen Granulozyten in die Zirkulation, wie in dieser und anderen experimentellen Arbeiten sowie klinischen Studien gezeigt (Morrison et al., 2011; Ross et al., 2007). Für die fehlende Augmentation durch G-CSF, das die Reifung und Freisetzung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark und anderen Organen mit

Speicherfunktion, wie der Lunge fördert (Bierman et al., 1952), ist möglicherweise der frühe Untersuchungszeitpunkt verantwortlich zu machen. Der Wachstumsfaktor wirkt selbst nicht chemokinetisch, sondern über sekundäre Mechanismen wie die verminderte Expression von SDF-1 (IL-12) und seinem Rezeptor CXCR-4, die zur Freisetzung von Granulozyten aus dem Knochenmark notwendig sind (Christopher et al., 2007; Levesque et al., 2009). Obwohl zusätzlich die durchschnittliche Zykluszeit bei Mäusen um 35 % und bei Menschen um 65 % verkürzt wird, erfolgt die postmitotische Freisetzung trotzdem erst nach 1 bis 2 Tagen statt 3 bis 4 Tagen (Lord et al., 1992; Schmitz et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit war eine signifikante T- und B-Lymphopenie der Schlaganfallgeschädigten Mäuse auffällig im Vergleich zur Scheinoperation, die Ausdruck der peripheren Immundepression nach einem Schlaganfall ist. Sie ist gekennzeichnet durch einen massiven Verlust von B- und T-Lymphozyten in den sekundär lymphatischen Organen, die innerhalb der ersten 24 Stunden beginnt und ihr Maximum 3 bis 4 Tage nach einem Schlaganfall erreicht (Offner et al., 2006; Seifert et al., 2012). Ihr Vorliegen ist mit der hohen Rate infektiöser Komplikationen bei Schlaganfallpatienten, insbesondere dem Auftreten von Pneumonien und Harnwegsinfekten assoziiert (Dirnagl et al., 2007). Mechanistisch liegt u. a. eine Überaktivierung des sympathischen Nervensystems mit katecholaminvermittelter Apoptose von B- und T-Lymphozyten zugrunde (Prass et al., 2003). Eine Differenzierung der T-Zellsubpopulationen in dieser Arbeit ergab, dass insbesondere T-Helferzellen durch den Schlaganfall signifikant abnahmen. Diese Tatsache konnte ebenfalls in Schlaganfallpatienten nachgewiesen werden (Hug et al., 2009).

Aber auch die Zahl zytotoxischer T-Zellen sank. Die Therapie mit G-CSF veränderte das Verhältnis aus zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen nicht zusätzlich. Unbeeinflusst blieben natürliche Killerzellen, entgegen den Beobachtungen von Hug und Kollegen (2009) im humanen Schlaganfall, wo sie ebenfalls in verringerter Zahl vorlagen. Dagegen waren im peripheren Blut der Mäuse, die mit hochdosiertem G-CSF behandelt wurden, nach 24 Stunden signifikant mehr CD4/CD25-positive T-Zellen nachzuweisen als bei der Niedrigdosis. Gegenüber dem unbehandelten Schlaganfall war der Mittelwertunterschied deutlich, aber nicht signifikant. Es ist anzunehmen, dass CD4/CD25-positive T-Zellen den regulatorischen T-Zellen zuzuordnen sind, obwohl der spezifischere Marker Foxp3 nicht untersucht wurde, da dieser intrazellulär liegt und im vorliegenden Versuchsdesign nicht verwendet werden konnte. In der Tat wird der G-CSF-Rezeptor auch auf T- und B-Lymphozyten exprimiert, sodass die Effekte von G-CSF nicht auf myeloide Zellen beschränkt sind (Morikawa et al.,

2002). Zahlreiche Arbeiten konnten zeigen, dass G-CSF Einfluss auf T-Zellantworten nimmt, u. a. indem er das Gleichgewicht hin zu Th2-polarisierten T-Zellen verschiebt und die Freisetzung IL-10-produzierender regulatorischer T-Zellen fördert (Pan et al., 1995; Rutella et al., 2004/2007; Franzke et al., 2006; Wagner et al., 2014). Subtypen dendritischer Zellen nehmen dabei entscheidenden Einfluss (Rutella et al., 2004/2007). In der Frühphase des Schlaganfalls, die hier untersucht wurde, spielt die adaptive Immunantwort allerdings keine Rolle. Zu diesem Zeitpunkt werden regulatorischen T-Zellen über eine Verlegung der Mikrozirkulation eine schädigende Rolle zugeschrieben (Kleinschnitz et al., 2013). Man könnte daher schlussfolgern, dass sich die höhere Zahl regulatorischer T-Zellen im Blut von Mäusen, die mit einer Hochdosis-G-CSF-Therapie behandelt wurden, eher ungünstig auf die Infarktentwicklung und das funktionelle Outcome auswirkt. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich immunologische Endpunkte betrachtet wurden, sind hier weiterführende Untersuchungen notwendig. Erst mit mehrtägiger Latenz nehmen regulatorische T-Zellen protektiven Einfluss auf die postischämische Entzündungsreaktion (Liesz et al., 2009). Dendritische Zellen werden durch regulatorische T-Zellen angeregt vermehrt immunsupprimierende Zytokine zu produzieren (Serra et al., 2003) und gehindert Effektor-T-Zellen zu aktivieren (Tadokoro et al., 2006). Zu diesem Zeitpunkt führt die Depletion von regulatorischen T-Zellen zu einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IFN- γ durch ortsständige Mikroglia und eingewanderte T-Lymphozyten. Sie ist mit einem verstärkten Infarktwachstum und einem schlechteren funktionellen Outcome assoziiert. Unklar bleibt daher auch, inwieweit G-CSF über die Beeinflussung regulatorischer T-Zellen mittel- bis langfristig eher günstige Effekte auf die Entzündungsreaktion hat.

Weder der Schlaganfall selbst noch die Behandlung mit G-CSF führte in dieser Arbeit zu einer relevanten Veränderung des Milzgewichts. Ein Grund hierfür ist sicherlich der frühe Untersuchungszeitpunkt, da die oben erwähnte Atrophie der sekundär lymphatischen Organe nach einem Schlaganfall in der Regel erst nach ca. 3 Tagen eintritt (Offner et al., 2006). G-CSF führte in zahlreichen Arbeiten zu einer Zunahme des Milzgewichts. In einigen Fällen traten sogar Milzrupturen auf. Diese Beobachtung ist allerdings ebenfalls erst mit mehrtägiger Latenz zum Therapiebeginn nachweisbar (Roberts et al., 2000; Masood et al., 2008). Daneben zeigte sich in allen Gruppen, auch den scheinoperierten Mäusen, eine Gewichtsabnahme von etwa 10 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht, die auf Narkose und Operationsstress zurückzuführen ist. Im Verlauf ist bei den Schlaganfallgeschädigten Mäusen ein fortschreitender Gewichtsverlust zu erwarten, der von der Größe des Infarktes und da-

mit der Beeinträchtigung der Versuchstiere abhängt. Das Gewicht scheinoperierter Mäuse erholt sich in diesem Zeitraum dagegen wieder und steigt auf das Vorniveau (Liesz et al., 2009; Minnerup et al., 2009). Die Behandlung mit G-CSF führte zu keiner signifikanten Veränderung des Körpergewichts nach 24 Stunden, wie auch andere Arbeitsgruppen berichtet haben (Schäbitz et al., 2003; Gibson et al., 2005).

5.7 Methodische Einflussfaktoren und Limitationen der Arbeit

Im Folgenden soll auf einige grundlegende methodische Einflussfaktoren und Limitationen der Arbeit eingegangen werden.

5.7.1 Berechnung der murinen Äquivalenzdosis

Die Rückrechnung der G-CSF-Dosis, die in der AX200-Studie an 328 Schlaganfallpatienten eingesetzt wurde, erfolgte mit der körperoberflächennormierten Formel von Reagan-Shaw (Reagan-Shaw et al., 2008). Sie korreliert in Säugetieren gut mit Stoffwechselfparametern wie Sauerstoff-Verwertung, Kalorienverbrauch, Blutvolumen und Nierenfunktion und ist damit besser geeignet als eine einfache Dosiskonversion auf Basis des Körpergewichts. Die in der AX200-Studie applizierte Dosis wurde im Rahmen einer Dosisescalationsstudie festgelegt, die den Dosierungsbereich erfolgreicher präklinischer Studien in vier Abstufungen (30, 90, 135 und 180 µg/kgKG) testete und damit eine solche einfache Dosiskonversion vornahm. Wendet man stattdessen die o. g. körperoberflächennormierte Formel an, ergibt sich, dass in der klinischen Studie eine 10- bis 20-fach höhere Dosierung eingesetzt wurde als in den experimentellen Studien. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass nachteilige immunologische Effekte des G-CSF die erfolgreiche Translation verhindert haben könnten. Die Autoren der AX200-Studie selbst spekulierten, dass eine erhöhte Körpertemperatur und Granulo- bzw. Monozytose in der Therapiegruppe zum Scheitern der Studie beigetragen haben könnten. Einige Studien konnten tatsächlich darlegen, dass eine Dosisabhängigkeit der immunologischen Effekte von G-CSF besteht (Rutella et al., 2005; Garcia et al., 2014).

Nach Durchführung der Experimente für die Arbeit kritisierten Blanchard und Kollegen, dass die humane Äquivalenzdosis (engl. Human Equivalent Dosis, HED), wie von Reagan-Shaw postuliert, nicht mit der pharmakologisch aktiven Dosis (engl. Pharmacological Active Dose, PAD) gleichzusetzen ist. Die korrektere, aber auch aufwendigere Variante zur Bestimmung der PAD ist das sogenannte „Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling (PBPK)“, eine mathematische Methode, die den

Körper als Zusammensetzung unterschiedlicher Kompartimente beschreibt. Die physikalischen Eigenschaften des Medikamentes und ihr speziesspezifischer Metabolismus werden ebenso beachtet, um Aufnahme, Verteilungsvolumen und Ausscheidung der Substanz im Zielorganismus vorherzusagen (Blanchard et al., 2015). Andere, weniger kritische Stimmen befürworten zwar die Zuhilfenahme der HED, fordern jedoch zusätzliche Anpassungen unter Beachtung der Applikationsform und Absorption, um die maximale empfohlene Anfangsdosis berechnen zu können (Nair et al., 2016).

5.7.2 Wahl des Schlaganfallmodells

Die experimentelle Schlaganfallforschung verfügt über eine Vielzahl von Modellen, um das Auftreten eines ischämischen Schlaganfalls in Versuchstieren zu modellieren. Die am häufigsten angewandte Methode ist der in dieser Studie eingesetzte transiente Verschluss der mittleren Hirnarterie mit einem Filament (tMCAO) (Chiang et al., 2011). Die tMCAO zeichnet sich durch gut reproduzierbare Infarkt volumina und variabel wählbare Verschlusszeiten aus (Canazza et al., 2014). Sie ist vor allem für Studien zur Neuroprotektion geeignet, da bereits nach kurzer Verschlusszeit eine ischämische Penumbra entsteht. Kritisiert wird, dass die schnelle Rezirkulation nach dem Fadenzug mit sofortiger Wiederherstellung des Energiestoffwechsels Therapieverfahren wie der interventionellen Thrombektomie näher kommt als dem natürlichen Verlauf des menschlichen Schlaganfalls (Hossmann et al., 2012). Er ist durch eine langsame und graduelle Rückbildung der Perfusionsstörung gekennzeichnet. Gegenüber permanenten Modellen wie dem distalen Verschluss der mittleren Hirnarterie, die diesen Nachteil nicht haben, besteht allerdings keine Notwendigkeit zur Kraniotomie. Thrombembolische Modelle, die die Pathophysiologie des humanen Schlaganfalls wahrscheinlich am besten widerspiegeln, sind durch eine extrem hohe Varianz des Infarktvolumens gekennzeichnet und werden daher primär eingesetzt, um neue thrombolytische Substanzen im Schlaganfall zu testen (Charmichael et al., 2005).

Dazu kommt, dass auch die Entzündungsreaktion nach einem Schlaganfall in Abhängigkeit des gewählten Modells variiert. So konnten Zhou und Kollegen belegen, dass der permanente Verschluss der distalen mittleren Hirnarterie durch Elektrokoagulation zu einer stärkeren Einwanderung von Immunzellen in das Infarktgebiet führt (Zhou et al., 2013). Diese Beobachtung steht möglicherweise auch mit der o. g. Kraniotomie in Verbindung. Klar ist, dass alle genannten Modelle immer nur Aspekte der humanen Pathophysiologie abbilden können. Aus diesem Grund sollten präklinische

Daten vor Translation eines Therapiekonzeptes immer in einem zweiten Schlaganfallmodell validiert werden. Experten raten zudem dazu, ihre Reproduzierbarkeit in einer zweiten Spezies, idealerweise am Großtier, wie z. B. dem Schaf, das wie der Mensch über ein gyrencephales Gehirn verfügt, zu prüfen (STAIR, 1999). Präklinische Tierstudien zum Effekt von G-CSF im Schlaganfall zeichnen sich nach Gesichtspunkten der STAIR-Kriterien vergleichend zu Studien anderer neuroprotektiver Substanzen durch eine hohe methodische Qualität aus. In Kleintiermodellen der Maus und Ratte wurden transiente wie auch permanente Schlaganfallmodelle untersucht, wobei sogar Komorbiditäten und das Alter als Einflussfaktoren Beachtung fanden (Minnerup et al., 2009; Lanfranconi et al., 2011).

5.7.3 Immunologische Unterschiede zwischen Maus und Mensch

Auch wenn das Immunsystem von Maus und Mensch in vielerlei Hinsicht vergleichbar ist, gibt es doch einige signifikante Unterschiede, die beachtet werden müssen, wenn Mäuse als Modell für menschliche Erkrankungen eingesetzt werden. Eine sehr offensichtliche Differenz zwischen beiden Spezies ist die Verteilung der Leukozytenpopulationen im Blut. So dominieren neutrophile Granulozyten mit 50 % bis 70 % das menschliche Blut, während in der Maus ein umgekehrtes Verhältnis mit 75 % bis 90 % Lymphozyten und 10 % bis 25 % Neutrophilen herrscht (Mestas et al., 2004). Auch ihre Funktionalität unterscheidet sich in Mensch und Maus. Andere Unterschiede sind z. B. für Chemokine und Chemokin-Rezeptoren und die T-Zellpolarisierung beschrieben. Während CXCR-1 und IL-8 zwar im Menschen exprimiert werden, kommen sie in der Maus nicht vor. Im Gegensatz dazu werden in beiden Spezies Th1- und Th2-Zellen gefunden, deren Ausprägungsform in Mäusen jedoch sehr viel akzentuierter ist als beim Menschen, wo häufig beide Zelltypen ähnliche Eigenschaften aufweisen (Mestas et al., 2004). 2013 erregte eine Studie großes Aufsehen, die eine schwache Korrelation der genomischen Antwort auf Entzündungsreize zwischen Mausmodellen und dem Mensch beschrieb (Soek et al., 2013). Auch wenn die Ergebnisse mittlerweile durch andere Arbeiten relativiert wurden (Takao et al., 2015), initiierten sie eine intensive Diskussion über den generellen Nutzen von Mausmodellen, insbesondere für immunologische Fragestellungen. Auch die Autoren der AX200-Studie hinterfragten die Wahl von Mäusen zur Nachstellung eines humanen Schlaganfalls für die Testung von Medikamenten (Ringelstein et al., 2013). Schließlich scheinen nicht die Unterschiede der inflammatorischen und immunologischen Antwort nach Schlaganfall die ausschlaggebenden Faktoren zu sein, da bildgebende Verfahren, histopathologische Methoden und Biomarker-Befunde in huma-

nen und murinen Studien eine hohe Ähnlichkeit nahelegten. Vielmehr müssen interne und externe Einflüsse wie der Gegensatz zwischen einem naiven Immunsystem in pathogenfrei gehaltenen jungen männlichen Mäusen und einem Immunsystem in älteren multimorbiden Patienten beider Geschlechter im Studiendesign mehr Berücksichtigung finden (Dirnagl et al., 2014).

5.7.4 Methoden und Versuchstieranzahl

Je nach Größe des Infarktvolumens variiert die Anzahl der geschädigten Zellen und damit möglicherweise auch die Stärke der Immunantwort. Vorherige Studien der Arbeitsgruppe konnten belegen, dass nach Etablierung der operativen Prozedur reproduzierbare Infarktvolumina zu messen waren. Aus diesem Grund gehörte die Entwicklung des Infarktvolumens nicht zu den Fragestellungen der vorliegenden Arbeit und wurde daher auch nicht in die Auswertung einbezogen. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten wurde demnach nicht auf die tatsächliche Größe des Schlaganfalls normiert, wie es in anderen Arbeiten beschrieben wurde (Ballesteros et al., 2014). Somit kann kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Infarktgröße und der Zahl einwandernder Zellen aufgezeigt werden.

Ursächlich für die geringe Gruppengröße von $n = 6$ für die durchflusszytometrischen Analysen und $n = 3$ für die immunhistochemischen Untersuchungen sind die in der vorliegenden Arbeit gewählten Endpunktanalysen, bei denen es sich um sehr zeitaufwändige Verfahren handelt. Dies führte zu der Überlegung die Anzahl der untersuchten Tiere zu verringern. Damit wurden teilweise hohe Standardabweichungen in den Schlaganfallgruppen in Kauf genommen, die die Teststärke der Studie minderten.

5.7.4.1 Durchflusszytometrie

Eine in der Immunologie weit verbreitete Arbeitsweise ist die in dieser Arbeit eingesetzte Durchflusszytometrie, mit deren Hilfe sich schnell und reproduzierbar unterschiedliche Zelltypen gleichzeitig in einem biologischen Replikat beurteilen lassen (Pösel et al., 2016). Zuvor müssen die Proben in zumeist aufwendigen und fehleranfälligen Prozessen aufbereitet werden. So ist das Erstellen einer Einzelzellsuspension für die Durchflusszytometrie bei Gehirngewebe aufgrund des lipidreichen Myelins schwierig. Während bei einer mangelhaften Aufreinigung viele Entzündungszellen in den Geweberesiduen verbleiben und nicht im Durchflusszytometer detektiert werden, drohen bei übermäßigem Zellstress Apoptose und die Internalisierung von Re-

zeptoren, die für die Identifikation der Zelle wichtig sind. Die zentralen Arbeitsschritte – mechanische Dissoziation durch ein Zellsieb, enzymatischer Verdau mit Liberase und nachfolgende Dichtegradientenzentrifugation zur Abtrennung des Myelin – müssen deshalb mit hoher Sorgfalt durchgeführt werden, um den Erfolg der Methode nicht zu gefährden. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist daher maßgeblich von der Einhaltung des Protokolls und der Erfahrung des Untersuchers in der Anwendung der Methode abhängig (Ballesteros et al., 2014; Pösel et al., 2016). In einem Durchgang wurden drei Gehirne gleichzeitig bearbeitet, sodass von Beginn der Probengewinnung bis zum Ende der Auswertung mittels Durchflusszytometrie ca. 8 Stunden benötigt wurden. Da sich nach Analyse der o. g. Tierzahlen hinsichtlich der primären Fragestellung (verstärkt G-CSF die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Gehirn) kein Mittelwertunterschied erkennen ließ, wurde nach dem 3R-Prinzip auf eine Erweiterung der Gruppen um zusätzliche Tiere verzichtet.

5.7.4.2 Immunhistochemie

Die Stärke der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass die Quantifizierung der eingewanderten Immunzellen nach einem Schlaganfall mit oder ohne G-CSF durch Informationen über die räumliche Organisation des Entzündungszellinfiltrats ergänzt wurde. Hierfür wurde die immunhistochemische Markierung von neutrophilen Granulozyten eingesetzt und eine Differenzierung nach Zelllokalisierung sowie -morphologie vorgenommen.

Die immunhistochemischen Analysen zur räumlichen Verteilung der eingewanderten neutrophilen Granulozyten bedeuteten ebenfalls einen sehr hohen Arbeitsaufwand. Durch die starke Heterogenität der Zellverteilung in der ischämischen Hemisphäre musste eine lückenlose Durchmusterung der betrachteten Hirnhälfte vorgenommen werden. Daher wurden lediglich repräsentative Objektträger des Infarktkerns ausgewertet und nicht der gesamte Infarktbereich. Die in der Histologie häufig genutzte Methode der Stereologie kam aufgrund der eben beschriebenen Überlegungen nicht zur Anwendung, obwohl sie unter bestimmten Bedingungen Vorteile bietet. Sie zeichnet sich durch eine erhöhte Genauigkeit der Quantifizierung aus, indem die Auswertung annähernd unverzerrt durch systematische Fehler erfolgt (West et al., 1999). Neben einer zufälligen Auswahl der Stichproben (Objektträger) trägt die statistisch fundierte Abschätzung der Zellzahl nach Analyse von gleichgroßen Zählseinheiten innerhalb eines zufällig angelegten Zählgitters zur Optimierung der Genauigkeit bei. Dabei wird ein zuvor festgelegtes Zählschema genutzt.

Um die Methode trotzdem den stereologischen Prinzipien anzunähern, wurde das Werkzeug „Optical Fractionator“ des Programms Stereo Investigator genutzt und standardisierte Voreinstellungen für alle Hirnschnitte vorgenommen. Dadurch wurde gewährleistet, dass alle Regionen des Präparats unter denselben Bedingungen durchmustert und alle Markierungen automatisch registriert wurden. Die Zuordnung der antikörpermarkierten Zellen hinsichtlich ihrer Lokalisation und Zellmorphologie erforderte einen zusätzlichen Bewertungsschritt. Für die Analyse wurden beide Hemisphären getrennt voneinander beurteilt. Die manuelle Auszählung nahm pro analysiertem Objektträger ca. 2 bis 4 Stunden in Anspruch.

Durch Abweichungen in der Markierungssetzung besteht die Gefahr der Beeinflussung der Distanz zweier Zellen in der Nearest-Neighbor-Analyse. Dieser Fehler wurde durch die Zusammenfassung in Abstandsintervallen minimiert. Gleichmaßen stellten unmittelbar nebeneinander liegende Zellen ein Problem in der Anwendung des Voronoi-Plugins dar. Voronoi-Linien konnten nur zwischen Zellen mit mindestens einem Bildpunkt Abstand gezogen werden, sodass eine Annäherung an die wahren Abstandverhältnisse vorgenommen wurde, die aber durch die hohe Anzahl an Zellen die beabsichtigte Aussage nicht beeinflusste.

5.8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden gemäß Zielstellung immunologische Endpunkte betrachtet. Weiterführende Arbeiten aus der Arbeitsgruppe konnten jedoch zeigen, dass Mäuse, die mit einer Hochdosis-G-CSF-Therapie behandelt wurden, nach 24 Stunden tatsächlich stärkere funktionelle Defizite aufwiesen. Inwieweit hierfür die verstärkte Einwanderung monozytärer Zellen in das ischämische Gehirn verantwortlich ist oder eine Zunahme des Perfusionsdefizits durch das Phänomen der Thromboinflammation, ist unklar. Unabhängig davon ist es vorstellbar, dass dosisabhängige immunologische Effekte des G-CSF zum Scheitern der AX200-Studie beigetragen haben. Als in diese Richtungweisendes Indiz könnte man auch die erhöhte Körpertemperatur und Granulo- sowie Monozytose in der Therapiegruppe interpretieren, die unter den geringeren Dosierungen in den präklinischen Studien nicht beschrieben waren.

Interessanterweise zeigte sich in der AX200-Studie zudem, dass mit G-CSF behandelte Schlaganfallpatienten initial größere Perfusionsdefizite, im Verlauf aber gleiche Infarkt volumina aufwiesen. Daher wurde seitens der Autoren ein möglicher Einfluss des Wachstumsfaktors auf die sekundäre Infarktexpansion diskutiert. Hier sind wei-

terführende Arbeiten notwendig, die die längerfristige Wirkung einer hochdosierten G-CSF-Behandlung auf die zelluläre Immunantwort nach einem Schlaganfall untersuchen. Neben der Neutrophilenmobilisation beeinflusst G-CSF die angeborene und adaptive Immunantwort auf vielfältige Weise. Tatsächlich konnte eine neue Studie der Arbeitsgruppe zeigen, dass der Wachstumsfaktor G-CSF bei anhaltender Gabe die Einwanderung von inflammatorischen Monozyten in das Infarktgebiet über eine veränderte Adhäsionsmolekülexpression hemmt. Diese Beobachtung war mit einem geringeren Hirnödem und einem besseren funktionellen Outcome nach 4 Tagen assoziiert (Weise et al., 2017). Regulatorische T-Zellen gelten in der Frühphase aufgrund der Verstärkung der Thromboinflammation durch erhöhte Interaktion mit Endothelzellen und Thrombozyten als schädigend, wohingegen nach etwa einer Woche IL-10- und TGF- β -abhängige antiinflammatorischen Eigenschaften überwiegen (Liesz et al., 2009; Kleinschnitz et al., 2013). Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass das bloße Verhindern der Einwanderung bestimmter Zellarten nicht zielführend ist. Es wäre stattdessen ein verzögerter Behandlungsbeginn zu überlegen, um schädliche Wirkungen in der Frühphase zu vermeiden, ohne auf spätere vorteilhafte Effekte zu verzichten. Für Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinase (MMP) wurde in ähnlicher Weise gezeigt, dass ihr Einsatz nur in der Frühphase des Schlaganfalls sinnvoll ist. Während MMPs in den ersten 24 Stunden entscheidend an der Störung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind, spielen sie im Verlauf für Reparaturprozesse, insbesondere für Angio- und Neurogenese eine zentrale Rolle (Yang et al., 2015).

Aufgrund der Komplexität der Immunantwort nach einem Schlaganfall ist der Ansatz nur an einer Schaltstelle zu manipulieren zu simplifizierend. Auch die generelle Übertragung präklinischer auf klinische und da von Phase-II- auf Phase-III-Studien kann Fehlerquellen aufweisen (del Zoppo et al., 2010). In zukünftigen Schlaganfallstudien sollte neben der adäquaten Dosiskonversion zwischen unterschiedlichen Spezies auch die zeitabhängige Wirkungsweise der untersuchten Substanz beachtet werden.

6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Einfluss unterschiedlicher Dosierungen einer Therapie mit dem Granulozyten Kolonie-stimulierenden Faktor auf die frühe Entzündungsreaktion im murinen Schlaganfallmodell

eingereicht von: Sophie Cerwenka

angefertigt am: Fraunhofer-Institut für Immunologie und Zelltherapie IZI Leipzig,
Universität Leipzig

betreut von: Professor Dr. med. Frank Emmrich

Dezember 2017

Der Schlaganfall als zweithäufigste Todesursache weltweit, betrifft jährlich in Deutschland mehr als 1,76 Millionen Menschen. Gravierend sind insbesondere die bleibenden neurologischen Defizite, die eine enorme Einschränkung für die Betroffenen darstellen und die Gesundheitsausgaben stark belasten. Da die bisherigen Behandlungsmethoden mit lytischer oder mechanischer Eröffnung des verschlossenen Gefäßes durch zahlreiche Kontraindikationen wie der zeitlichen Begrenzung nur einem geringen Patientenkreis vorbehalten sind, ist die Suche nach einem universeller einsetzbaren Therapieansatz ein Hauptanliegen in der Schlaganfallforschung. Vielversprechende Ergebnisse werden bereits seit über zehn Jahren mithilfe der neuroprotektiven und -regenerativen Eigenschaften des Wachstumsfaktors G-CSF in zahlreichen Kleintiermodellen erzielt. Die erfolgreiche Übersetzung auf eine multi-zentrische randomisierte Phase-IIa-Studie blieb jedoch aus. Zwar wurde eine gute

Verträglichkeit beobachtet, doch konnte keine Verbesserung des Outcomes der Schlaganfallpatienten herbeigeführt werden. Bei näherer Betrachtung fiel eine deutlich höhere Dosierung des Wachstumsfaktors in der humanen Studie im Vergleich zu den erfolgreichen präklinischen Studien auf, sodass Fragen nach einem schädigenden Einfluss möglicher immunologischer Veränderungen aufkamen.

1. Führt G-CSF in niedriger und/oder hoher Dosierung zu einer verstärkten Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das schlaganfallgeschädigte Gehirn?
2. Nimmt G-CSF (dosisabhängig) weitere Einflüsse auf die Zusammensetzung des frühen entzündlichen Infiltrats im Gehirn?
3. Verändert G-CSF neben möglichen quantitativen Effekten auch die räumliche Verteilung bzw. die Zellmorphologie einwandernder neutrophiler Granulozyten?
4. Unterscheiden sich periphere immunologische Wirkungen des G-CSF (dosisabhängig) nach Schlaganfall?

Um dies zu überprüfen, wurde in einem murinen Schlaganfallmodell eine quantitative FACS-Analyse des frühen entzündlichen Hirninfiltrats und der Immunzellpopulationen im peripheren Blut mit besonderem Augenmerk auf neutrophile Granulozyten 24 Stunden nach (Schein-)Schlaganfall durchgeführt. Ergänzend erfolgte eine immunhistochemische Beurteilung des Infiltrationsverhaltens neutrophiler Granulozyten, wobei neben der räumlichen Verteilung die Zellmorphologie untersucht wurde. In der durchflusszytometrischen Betrachtung wurden naive Tiere und Tiere mit Scheinoperation den Gruppen mit alleiniger Ischämie (MCAO), MCAO und Niedrigdosis-G-CSF-Therapie (50 µg/kgKG) sowie MCAO und Hochdosis-G-CSF-Therapie (832,5 µg/kgKG) gegenüber gestellt. Die immunhistochemische Analyse verglich lediglich die Schlaganfallgruppen. Zusammenfassend zeigte sich in dieser Arbeit, dass die Behandlung mit G-CSF, unabhängig von der Dosierung, 24 Stunden nach experimentellem Schlaganfall nicht zu einer verstärkten Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Infarktgebiet führt. Anstelle der Granulozyten zeigte sich aber eine Zunahme von inflammatorischen Monozyten und einer Ly6C/MHC-II-positiven Mischpopulation aus Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen im ischämischen Gehirn, deren Bedeutung für die dortige Entzündungsreaktion unklar ist. Wie auf die Infiltration von neutrophilen Granulozyten an sich nahm G-CSF ebenso wenig Einfluss auf die räumliche Verteilung der Granulozyten, die überwiegend im temporoparietalen Kortex und den benachbarten Hirnhäuten lokalisiert wa-

ren und damit eine leptomeningeale Migrationsroute nahe liegt. Auch die Kinetik der Einwanderung wurde durch G-CSF nicht verändert, wenn man die Gleichverteilung runder und stäbchenförmiger neutrophiler Granulozyten in den Experimentalgruppen zugrunde legt, die Ausdruck unterschiedlicher Stadien der Transmigrationskaskade sind. Im peripheren Blut kam es durch den Schlaganfall zu einer deutlichen Verschiebung der Leukozytensubpopulationen hin zu neutrophilen Granulozyten. Dieser Effekt wurde durch die Behandlung mit G-CSF zu dem frühen Untersuchungszeitpunkt nach 24 Stunden nicht verstärkt. Auffällig war zudem ein Anstieg von regulatorischen T-Zellen im Blut der mit der hohen G-CSF-Dosis behandelten Versuchstiere. Die Zahl der T- und B-Lymphozyten sank hingegen im peripheren Blut der Schlaganfallgruppen und kann als Zeichen der Immunsuppression gewertet werden. Mittlerweile belegen immer mehr Arbeiten, dass Immunzellen zeitabhängig entzündungsfördernde oder -hemmende Eigenschaften aufweisen. So nehmen inflammatorische Monozyten auf die Gefäßintegrität und Ausbildung von antiinflammatorischen M2-Makrophagen im Schlaganfall Einfluss. Regulatorische T-Zellen wiederum werden in der Frühphase des Schlaganfalls über die Interaktion mit Thrombozyten und Endothelzellen mit einer zunehmenden Störung der Mikrozirkulation in Verbindung gebracht (sogenannte Thromboinflammation), wohingegen in der subakuten Phase IL-10- und TGF- β -abhängige positive Effekte beschrieben wurden. Letztlich legen die Ergebnisse nahe, dass in zukünftigen Studien die zeitabhängige Wirkungsweise von Substanzen ebenso wie eine differenzierte Dosiskonversion in den menschlichen Organismus stärker Beachtung finden sollten.

Literaturverzeichnis

Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24(1):35-41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678184>.

Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke*. 1996;27(10):1739-43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8841321>.

Arac A, Grimbaldston MA, Nepomuceno ARB, et al. Evidence that meningeal mast cells can worsen stroke pathology in mice. *Am J Pathol*. 2014;184(9):2493-504. doi:10.1016/j.ajpath.2014.06.003.

Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood*. 2000;95(8):2484-90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753825>.

Audoy-Rémus J, Richard J-F, Soulet D, Zhou H, Kubes P, Vallières L. Rod-Shaped monocytes patrol the brain vasculature and give rise to perivascular macrophages under the influence of proinflammatory cytokines and angiopoietin-2. *J Neurosci*. 2008;28(41):10187-99. doi:10.1523/JNEUROSCI.3510-08.2008.

Bainton DF, Farquhar MG. Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. II. Cytochemistry and electron microscopy of bone marrow cells. *J Cell Biol*. 1968;39(2):299-317. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2107532&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*. 2004;16(1):1-13. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016.

Ballesteros I, Cuartero MI, Moraga A, de la Parra J, Lizasoain I, Moro MÁ. Stereological and flow cytometry characterization of leukocyte subpopulations in models of transient or permanent cerebral ischemia. *J Vis Exp*. 2014;(94). doi:10.3791/52031.

Barone FC, Hillegass LM, Tzimas MN, et al. Time-related changes in myeloperoxidase activity and leukotriene B4 receptor binding reflect leukocyte influx in cerebral focal stroke. *Mol Chem Neuropathol*. 1995;24(1):13-30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7755844>.

Bath PMW, Sprigg N, England T. Colony stimulating factors (including erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and analogues) for stroke. *Cochrane database Syst Rev*. 2013;6:CD005207. doi:10.1002/14651858.CD005207.pub4.

Béjot Y, Daubail B, Giroud M. Epidemiology of stroke and transient ischemic attacks: Current knowledge and perspectives. *Rev Neurol (Paris)*. 2016;172(1):59-68. doi:10.1016/j.neurol.2015.07.013.

- Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, et al. A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 2014;141217070022009. doi:10.1056/NEJMoa1411587.
- Bierman HR, Kelly KH, Cordes FL, Byron RL, Polhemus JA, Rappoport S. The Release of Leukocytes and Platelets from the Pulmonary Circulation by Epinephrine. *Blood*. 1952;7(7). Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/7/7/683.long?sso-checked=true>.
- Blanchard OL, Smoliga JM. Translating dosages from animal models to human clinical trials - revisiting body surface area scaling. *FASEB J*. 2015;29(5):1629-1634. doi:10.1096/fj.14-269043.
- Boneberg E-M, Hareng L, Gantner F, Wendel A, Hartung T. Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon- γ . *Blood*. 2000;95(1). Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/95/1/270.long?sso-checked=true#ref-1>.
- Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997;89(10):3503-21. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/89/10/3503.abstract>.
- Breckwoldt MO, Chen JW, Stangenberg L, et al. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(47):18584-9. doi:10.1073/pnas.0803945105.
- Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(8):577-82. doi:10.1038/nrmicro1710.
- Canazza A, Minati L, Boffano C, Parati E, Binks S. Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Front Neurol*. 2014;5:19. doi:10.3389/fneur.2014.00019.
- Carmichael ST, Kathirvelu B, Schweppe CA, Nie EH. Molecular, cellular and functional events in axonal sprouting after stroke. *Exp Neurol*. 2016. doi:10.1016/j.expneurol.2016.02.007.
- Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*. 2005;2(3):396-409. doi:10.1602/neurorx.2.3.396.
- Carulli G, Minnucci S, Azzarà A, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administration increases PMN CD32 (FcR2) expression and FcR-related functions. *Haematologica*. 80(2):150-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543071>.
- Chakraborty A, Hentzen ER, Seo SM, Smith CW. Granulocyte colony-stimulating factor promotes adhesion of neutrophils. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2003;284(1). Available at: <http://ajpcell.physiology.org/content/284/1/C103.long>.
- Chen H, Song YS, Chan PH. Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(7):1262-72. doi:10.1038/jcbfm.2009.47.

- Chen W, Sun Y, Liu K, Sun X. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia. *Neural Regen Res*. 2014;9(12):1210-6. doi:10.4103/1673-5374.135329.
- Cheng CW, Niu B, Warren M, et al. Predicting the spatiotemporal dynamics of hair follicle patterns in the developing mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(7):2596-601. doi:10.1073/pnas.1313083111.
- Chiang T, Messing RO, Chou W-H. Mouse model of middle cerebral artery occlusion. *J Vis Exp*. 2011;(48). doi:10.3791/2761.
- Choe M, Cortés E, Vonsattel J-PG, Kuo S-H, Faust PL, Louis ED. Purkinje cell loss in essential tremor: Random sampling quantification and nearest neighbor analysis. *Mov Disord*. 2016;31(3):393-401. doi:10.1002/mds.26490.
- Christopher MJ, Link DC. Regulation of neutrophil homeostasis. *Curr Opin Hematol*. 2007;14(1):3-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17133093>.
- Christy AL, Walker ME, Hessner MJ, Brown MA. Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. *J Autoimmun*. 2012;null(null). doi:10.1016/j.jaut.2012.11.003.
- Chu HX, Broughton BRS, Ah Kim H, Lee S, Drummond GR, Sobey CG. Evidence That Ly6C hi Monocytes Are Protective in Acute Ischemic Stroke by Promoting M2 Macrophage Polarization. *Stroke*. 2015;46(7):1929-1937. doi:10.1161/STROKEAHA.115.009426.
- Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, et al. N2 Neutrophils, Novel Players in Brain Inflammation After Stroke: Modulation by the PPAR Agonist Rosiglitazone. *Stroke*. 2013;44(12):3498-3508. doi:10.1161/STROKEAHA.113.002470.
- Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, et al. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood*. 2012;120(10):2133-43. doi:10.1182/blood-2012-06-437772.
- De Meyer SF, Denorme F, Langhauser F, Geuss E, Fluri F, Kleinschnitz C. Thromboinflammation in Stroke Brain Damage. *Stroke*. 2016;47(4):1165-1172. doi:10.1161/STROKEAHA.115.011238.
- del Zoppo GJ. Acute anti-inflammatory approaches to ischemic stroke. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1207:143-8. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05761.x.
- Demers M, Krause DS, Schatzberg D, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(32):13076-81. doi:10.1073/pnas.1200419109.
- Demetri G, Griffin J. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 1991;78(11). Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/78/11/2791.long>.
- Dietel B, Cicha I, Kallmünzer B, et al. Suppression of dendritic cell functions contributes to the anti-inflammatory action of granulocyte-colony stimulating factor in experimental stroke. *Exp Neurol*. 2012;237(2):379-87. doi:10.1016/j.expneurol.2012.06.019.

- Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic A V. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke*. 2007;38(4):1345-53. Available at: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/content/abstract/38/4/1345>.
- Dirnagl U, et al., Members of the MCAO-SOP. Standard operating procedures (SOP) in experimental stroke research: SOP for middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Nature Precedings*. 2009. Available at: <hdl.handle.net/10101/npre.2009.3492.1>.
- Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS, et al. Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke*. 2007;38(2 Suppl):770-3. doi:10.1161/01.STR.0000251441.89665.bc.
- Dirnagl U. Modeling immunity and inflammation in stroke: can mice be trusted? *Stroke*. 2014;45(9):e177-8. doi:10.1161/STROKEAHA.114.005640.
- Duelsner A, Gatzke N, Glaser J, et al. Granulocyte colony-stimulating factor improves cerebrovascular reserve capacity by enhancing collateral growth in the circle of Willis. *Cerebrovasc Dis*. 2012;33(5):419-29. doi:10.1159/000335869.
- Easton AS. Neutrophils and stroke - can neutrophils mitigate disease in the central nervous system? *Int Immunopharmacol*. 2013;17(4):1218-25. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.015.
- Ehrengruber MU, Deranleau DA, Coates TD. Shape oscillations of human neutrophil leukocytes: characterization and relationship to cell motility. *J Exp Biol*. 1996;199(Pt 4):741-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8788084>.
- Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V. Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp*. 2011;(47). doi:10.3791/2423.
- England TJ, Gibson CL, Bath PMW. Granulocyte-colony stimulating factor in experimental stroke and its effects on infarct size and functional outcome: A systematic review. *Brain Res Rev*. 2009;62(1):71-82. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.09.002.
- England TJ, Sprigg N, Alasheev AM, et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) for stroke: an individual patient data meta-analysis. *Sci Rep*. 2016;6(1):36567. doi:10.1038/srep36567.
- Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. *Neurology*. 2001;57(8):1428-34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673584>.
- Enzmann G, Mysiorek C, Gorina R, et al. The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury. *Acta Neuropathol*. 2013;125(3):395-412. doi:10.1007/s00401-012-1076-3.
- Faraday N, Schunke K, Saleem S, et al. Cathepsin G-dependent modulation of platelet thrombus formation in vivo by blood neutrophils. *PLoS One*. 2013;8(8):e71447. doi:10.1371/journal.pone.0071447.

- Flügel A, Schwaiger FW, Neumann H, et al. Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathol.* 2000;10(3):353-64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10885654>.
- Franklin K B J, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates, third edition. Academic Press. 2007. ISBN-13: 978-0123694607.
- Franzke A. The role of G-CSF in adaptive immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(4):235-44. doi:10.1016/j.cytogfr.2006.05.002.
- Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15880-5. doi:10.1073/pnas.1005743107.
- Fusté B, Mazzara R, Escolar G, Merino A, Ordinas A, Díaz-Ricart M. Granulocyte colony-stimulating factor increases expression of adhesion receptors on endothelial cells through activation of p38 MAPK. *Haematologica.* 2004;89(5):578-85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15136221>.
- Gan Y, Liu Q, Wu W, et al. Ischemic neurons recruit natural killer cells that accelerate brain infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2704-9. doi:10.1073/pnas.1315943111.
- Garcia NP, de Leon EB, da Costa AG, et al. Kinetics of mesenchymal and hematopoietic stem cells mobilization by G-CSF and its impact on the cytokine microenvironment in primary cultures. *Cell Immunol.* 2015;293(1):1-9. doi:10.1016/j.cellimm.2014.09.006.
- Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, et al. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood.* 2012;120(18):3793-802. doi:10.1182/blood-2012-02-412726.
- Gibson CL, Bath PM, Murphy SP. G-CSF Reduces Infarct Volume and Improves Functional Outcome after Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25(4):431-439. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600033.
- Gidday JM, Gasche YG, Copin J-C, et al. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(2):H558-68. doi:10.1152/ajpheart.01275.2004.
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:45. doi:10.3389/fncel.2013.00045.
- Gliem M, Mausberg AK, Lee J-I, et al. Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models. *Ann Neurol.* 2012;71(6):743-752. doi:10.1002/ana.23529.
- Greter M, Heppner FL, Lemos MP, et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2005;11(3):328-334. doi:10.1038/nm1197.

- Günster C (2011) Schlaganfallversorgung in Deutschland – Inzidenz, Wiederaufnahmen, Mortalität und Pflegerisiko im Spiegel von Routinedaten. In: Günster C, Klose J, Schmacke N (Hrsg) Versorgungs-Report 2011 – Schwerpunkt: Chronische Erkrankungen, Schattauer, Stuttgart, S. 147 – 163
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med.* 2008;359(13):1317-1329. doi:10.1056/NEJMoa0804656.
- Hammond MD, Taylor RA, Mullen MT, et al. CCR2+Ly6Chi Inflammatory Monocyte Recruitment Exacerbates Acute Disability Following Intracerebral Hemorrhage. *J Neurosci.* 2014;34(11):3901-3909. doi:10.1523/JNEUROSCI.4070-13.2014.
- Hasenberg A, Hasenberg M, Männ L, et al. Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat Methods.* 2015;12(5):445-52. doi:10.1038/nmeth.3322.
- Hasselblatt M, Jeibmann A, Riesmeier B, Maintz D, Schäbitz W-R. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and G-CSF receptor expression in human ischemic stroke. *Acta Neuropathol.* 2007;113(1):45-51. doi:10.1007/s00401-006-0152-y.
- Heiss W-D. The ischemic penumbra: correlates in imaging and implications for treatment of ischemic stroke. The Johann Jacob Wepfer award 2011. *Cerebrovasc Dis.* 2011;32(4):307-20. doi:10.1159/000330462.
- Heuschmann AP, Busse O, Wagner M, et al. Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland Frequency and Care of Stroke in Germany. *Akt Neurol.* 2010;37:333-340. doi:10.1055/s-0030-1248611.
- Heuschmann PU, Wiedmann S, Wellwood I, et al. Three-month stroke outcome: the European Registers of Stroke (EROS) investigators. *Neurology.* 2011;76(2):159-65. doi:10.1212/WNL.0b013e318206ca1e.
- Hill CP, Osslund TD, Eisenberg D. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(11):5167-71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46676&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hölig K, Kramer M, Kroschinsky F, et al. Safety and efficacy of hematopoietic stem cell collection from mobilized peripheral blood in unrelated volunteers: 12 years of single-center experience in 3928 donors. *Blood.* 2009;114(18):3757-63. doi:10.1182/blood-2009-04-218651.
- Hossmann K-A. The two pathophysiologicals of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(7):1310-6. doi:10.1038/jcbfm.2011.186.
- Hu X, Li P, Guo Y, et al. Microglia/Macrophage Polarization Dynamics Reveal Novel Mechanism of Injury Expansion After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke.* 2012;43(11):3063-3070. doi:10.1161/STROKEAHA.112.659656.

- Hug A, Dalpke A, Wieczorek N, et al. Infarct Volume is a Major Determiner of Post-Stroke Immune Cell Function and Susceptibility to Infection. *Stroke*. 2009;40(10):3226-3232. doi:10.1161/STROKEAHA.109.557967.
- Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011;17(7):796-808. doi:10.1038/nm.2399.
- Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME. Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Brain following Cerebral Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995;15(3):378-384. doi:10.1038/jcbfm.1995.47.
- Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi S, Yoshimura S, Nakashima S, Iwama T. Neutrophil elastase inhibitor prevents ischemic brain damage via reduction of vasogenic edema. *Hypertens Res*. 2010;33(7):703-7. doi:10.1038/hr.2010.58.
- Jaeger K, Ruschulte H, Heine J, et al. Neutrophil respiratory burst following liver transplantation: in vitro effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Transpl Infect Dis*. 1999;1(3):153-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11428985>.
- Jauch EC, Saver JL, Adams HP, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44(3):870-947. doi:10.1161/STR.0b013e318284056a.
- Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*. 2010;87(5):779-89. doi:10.1189/jlb.1109766.
- Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z. Initiation of Immune Responses in Brain Is Promoted by Local Dendritic Cells. *J Immunol*. 2004;173(4). Available at: <http://www.jimmunol.org/content/173/4/2353.long>.
- Kaushansky K. Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. *N Engl J Med*. 2006;354(19):2034-2045. doi:10.1056/NEJMra052706.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *J PLoS Biol*. 2010;8(6): e1000412. doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412.
- Kim E, Cho S. Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Stroke. *Neurotherapeutics*. 2016;13(4):702-718. doi:10.1007/s13311-016-0463-1.
- Kim JY, Kawabori M, Yenari MA. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets. *Curr Med Chem*. 2014;21(18):2076-97. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4104826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kleinschnitz C, Wiendl H. CON: Regulatory T Cells Are Protective in Ischemic Stroke. *Stroke*. 2013;44(8).
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*. 1986;8:1-8.

- Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D et al. Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke*. 2006; 37: 1179-1183
- Kolominsky-Rabas PL, Wiedmann S, Weingartner M et al. (2015) Time Trends in Incidence of Pathological and Etiological Stroke Subtypes during 16 Years: The Erlangen Stroke Project. *Neuroepidemiology* 44(1):24-29
- Kostulas N, Kivisakk P, Huang Y, Matusevicius D, Kostulas V, Link H. Ischemic Stroke Is Associated With a Systemic Increase of Blood Mononuclear Cells Expressing Interleukin-8 mRNA. *Stroke*. 1998;29(2):462-466. Available at: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/content/abstract/29/2/462>.
- Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective Ablation of Proliferating Microglial Cells Exacerbates Ischemic Injury in the Brain. *J Neurosci*. 2007;27(10).
- Lan X, Qu H, Yao W, Zhang C. Granulocyte-colony stimulating factor inhibits neuronal apoptosis in a rat model of diabetic cerebral ischemia. *Tohoku J Exp Med*. 2008;216(2):117-26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832793>.
- Lanfranconi S, Locatelli F, Corti S, et al. Growth factors in ischemic stroke. *J Cell Mol Med*. 2011;15(8):1645-87. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00987.x.
- Lee S-T, Chu K, Jung K-H, et al. Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2005;1058(1-2):120-8. doi:10.1016/j.brainres.2005.07.076.
- Levesque J-P, Winkler IG. Mobilization of hematopoietic stem cells: state of the art. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008;13(1):53-8. doi:10.1097/MOT.0b013e3282f42473.
- Li L, Klebe D, Doycheva D, et al. G-CSF ameliorates neuronal apoptosis through GSK-3 β inhibition in neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Exp Neurol*. 2015;263:141-9. doi:10.1016/j.expneurol.2014.10.004.
- Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med*. 2009;15(2):192-199. doi:10.1038/nm.1927.
- Lord BI. Myeloid cell kinetics in response to haemopoietic growth factors. *Baillieres Clin Haematol*. 1992;5(3):533-50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281018>.
- Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015;523(7560):337-41. doi:10.1038/nature14432.
- MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A, LOCATI M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015.

- Masood N, Shaikh AJ, Memon WA, Idress R. Splenic rupture, secondary to G-CSF use for chemotherapy induced neutropenia: a case report and review of literature. *Cases J.* 2008;1(1):418. doi:10.1186/1757-1626-1-418.
- Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, et al. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke.* 1994;25(7):1469-75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8023364>.
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:563-604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
- Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 2004;172(5):2731-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978070>.
- Michinaga S, Koyama Y. Pathogenesis of Brain Edema and Investigation into Anti-Edema Drugs. *Int J Mol Sci.* 16(5):9949-9975. doi:10.3390/ijms16059949.
- Minnerup J, Heidrich J, Wellmann J, Rogalewski A, Schneider A, Schäbitz W-R. Meta-analysis of the efficacy of granulocyte-colony stimulating factor in animal models of focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2008;39(6):1855-61. doi:10.1161/STROKEAHA.107.506816.
- Minnerup J, Sevimli S, Schäbitz W-R. Granulocyte-colony stimulating factor for stroke treatment: mechanisms of action and efficacy in preclinical studies. *Exp Transl Stroke Med.* 2009;1:2. doi:10.1186/2040-7378-1-2.
- Miró-Mur F, Pérez-de-Puig I, Ferrer-Ferrer M, et al. Immature monocytes recruited to the ischemic mouse brain differentiate into macrophages with features of alternative activation. *Brain Behav Immun.* 2016;53:18-33. doi:10.1016/j.bbi.2015.08.010.
- Möller K, Boltze J, Pösel C, Seeger J, Stahl T, Wagner D-C. Sterile inflammation after permanent distal MCA occlusion in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(2):307-15. doi:10.1038/jcbfm.2013.199.
- Morikawa K, Morikawa S, Nakamura M, Miyawaki T. Characterization of granulocyte colony-stimulating factor receptor expressed on human lymphocytes. *Br J Haematol.* 2002;118(1):296-304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12100165>.
- Morrison H, McKee D, Ritter L. Systemic neutrophil activation in a mouse model of ischemic stroke and reperfusion. *Biol Res Nurs.* 2011;13(2):154-63. doi:10.1177/1099800410384500.
- Morrison HW, Filosa JA. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation.* 2013;10:4. doi:10.1186/1742-2094-10-4.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69. doi:10.1038/nri2448.

- Müller F, Renné T. Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system. *Curr Opin Hematol.* 2008;15(5):516-521. doi:10.1097/MOH.0b013e328309ec85.
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007;204(12):3037-47. doi:10.1084/jem.20070885.
- Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J basic Clin Pharm.* 2016;7(2):27-31. doi:10.4103/0976-0105.177703.
- Neumann H, Cavalié A, Jenne DE, Wekerle H. Induction of MHC class I genes in neurons. *Science.* 1995;269(5223):549-52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7624779>.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJM. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain.* 2008;132(2):288-295. doi:10.1093/brain/awn109.
- Nieswandt B, Kleinschnitz C, Stoll G. Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease? *J Physiol.* 2011;589(17):4115-4123. doi:10.1113/jphysiol.2011.212886.
- Novella A, Bergamaschi G, Canale C, et al. Expression of adhesion molecules and functional stimulation in human neutrophils: modulation by GM-CSF and role of the Bcr gene. *Br J Haematol.* 1997;98(3):621-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9332317>.
- O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet.* 2010;376(9735):112-23. doi:10.1016/S0140-6736(10)60834-3.
- Offner H, Subramanian S, Parker SM, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol.* 2006;176(11):6523-31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16709809>.
- Ohab JJ, Carmichael ST. Poststroke neurogenesis: emerging principles of migration and localization of immature neurons. *Neuroscientist.* 2008;14(4):369-80. doi:10.1177/1073858407309545.
- Ohki Y, Heissig B, Sato Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *FASEB J.* 2005;19(14):2005-7. doi:10.1096/fj.04-3496fje.
- Pan L, Delmonte JJ, Jalonen C, Ferrara J. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood.* 1995;86(12).
- Pap M, Cooper GM. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem.* 1998;273(32):19929-32. doi:10.1074/JBC.273.32.19929.

- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677-91. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3003309&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol.* 1999;5(6):556-69. doi:10.3109/13550289909021285.
- Parent JM. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist.* 2003;9(4):261-72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12934709>.
- Patel AR, Ritzel R, McCullough LD, Liu F. Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2013;5(2):73-90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23750306>.
- Perez-de-Puig I, Miró-Mur F, Ferrer-Ferrer M, et al. Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. *Acta Neuropathol.* 2015;129(2):239-57. doi:10.1007/s00401-014-1381-0.
- Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med.* 2006;203(12):2569-75. doi:10.1084/jem.20060925.
- Popa-Wagner A, Stöcker K, Balseanu AT, et al. Effects of granulocyte-colony stimulating factor after stroke in aged rats. *Stroke.* 2010;41(5):1027-31. doi:10.1161/STROKEAHA.109.575621.
- Pösel C, Möller K, Boltze J, Wagner D-C, Weise G. Isolation and Flow Cytometric Analysis of Immune Cells from the Ischemic Mouse Brain. *J Vis Exp.* 2016;(108). doi:10.3791/53658.
- Prass K, Meisel C, Höflich C, et al. Stroke-induced Immunodeficiency Promotes Spontaneous Bacterial Infections and Is Mediated by Sympathetic Activation Reversal by Poststroke T Helper Cell Type 1-like Immunostimulation. *J Exp Med.* 2003;198(5):725-736. doi:10.1084/jem.20021098.
- Rausch M, Sauter A, Fröhlich J, Neubacher U, Radü EW, Rudin M. Dynamic patterns of USPIO enhancement can be observed in macrophages after ischemic brain damage. *Magn Reson Med.* 2001;46(5):1018-22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11675656>.
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008;22(3):659-61. doi:10.1096/fj.07-9574LSF.
- Ringelstein EB, Thijs V, Norrving B, et al. Granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute ischemic stroke: results of the AX200 for Ischemic Stroke trial. *Stroke.* 2013;44(10):2681-7. doi:10.1161/STROKEAHA.113.001531.
- Roberts AW, Hasegawa M, Metcalf D, Foote SJ. Identification of a genetic locus modulating splenomegaly induced by granulocyte colony-stimulating factor in mice. *Leukemia.* 2000;14(4):657-61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764151>.

- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(4):e18-e209. doi:10.1161/CIR.0b013e3182009701.
- Roilides E, Uhlig K, Venzon D, Pizzo PA, Walsh TJ. Neutrophil oxidative burst in response to blastoconidia and pseudohyphae of *Candida albicans*: augmentation by granulocyte colony-stimulating factor and interferon-gamma. *J Infect Dis*. 1992;166(3):668-73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1380052>.
- Rose S, Misharin A, Perlman H. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry A*. 2012;81(4):343-50. doi:10.1002/cyto.a.22012.
- Ross AM, Hurn P, Perrin N, Wood L, Carlini W, Potempa K. Evidence of the peripheral inflammatory response in patients with transient ischemic attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2007;16(5):203-7. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2007.05.002.
- Roy M, Richard J-F, Dumas A, Vallières L. CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. 2012;9:18. doi:10.1186/1742-2094-9-18.
- Russell J, Cooper D, Tailor A, Stokes KY, Granger DN. Low venular shear rates promote leukocyte-dependent recruitment of adherent platelets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284(1):G123-9. doi:10.1152/ajpgi.00303.2002.
- Rutella S, Bonanno G, Pierelli L, et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN- α . *Eur J Immunol*. 2004;34(5):1291-1302. doi:10.1002/eji.200324651.
- Rutella S. Granulocyte colony-stimulating factor for the induction of T-cell tolerance. *Transplantation*. 2007;84(1 Suppl):S26-30. doi:10.1097/01.tp.0000269611.66517.bf.
- Saito M, Kiyokawa N, Taguchi T, et al. Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion. *Exp Hematol*. 2002;30(10):1115-23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384141>.
- Saka O, McGuire A, Wolfe C. Cost of stroke in the United Kingdom. *Age Ageing*. 2008;38(1):27-32. doi:10.1093/ageing/afn281.
- Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis*. 2008;32(2):200-19. doi:10.1016/j.nbd.2008.08.005.
- Saver JL. Proposal for a universal definition of cerebral infarction. *Stroke*. 2008;39(11):3110-5. doi:10.1161/STROKEAHA.108.518415.
- Sayed BA, Christy AL, Walker ME, Brown MA. Meningeal mast cells affect early T cell central nervous system infiltration and blood-brain barrier integrity through TNF: a role for neutrophil recruitment? *J Immunol*. 2010;184(12):6891-900. doi:10.4049/jimmunol.1000126.

- Schäbitz W-R, Kollmar R, Schwaninger M, et al. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2003;34(3):745-51. doi:10.1161/01.STR.0000057814.70180.17.
- Schäbitz WR, Laage R, Vogt G, et al. AXIS: a trial of intravenous granulocyte colony-stimulating factor in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2010;41(11):2545-51. doi:10.1161/STROKEAHA.110.579508.
- Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*. 2003;183(1):25-33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957485>.
- Schilling M, Strecker J-K, Schäbitz W-R, Ringelstein EB, Kiefer R. Effects of monocyte chemoattractant protein 1 on blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*. 2009;161(3):806-12. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.025>.
- Schmitz S, Franke H, Brusis J, Wichmann HE. Quantification of the cell kinetic effects of G-CSF using a model of human granulopoiesis. *Exp Hematol*. 1993;21(6):755-60. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/7684699>.
- Schneider A, Krüger C, Steigleder T, et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115(8):2083-98. doi:10.1172/JCI23559.
- Schneider D, Berrouschot J, Brandt T, et al. Safety, pharmacokinetics and biological activity of enlimomab (anti-ICAM-1 antibody): an open-label, dose escalation study in patients hospitalized for acute stroke. *Eur Neurol*. 1998;40(2):78-83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9693236>.
- Schneider K, Heise M, Heuschmann P et al. (2009) Lebens- und Versorgungssituation von Schlaganfallpatienten. *Nervenheilkunde* 28(3):114-118.
- Schoergenhofer C, Schwameis M, Wohlfarth P, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) increases histone-complexed DNA plasma levels in healthy volunteers. *Clin Exp Med*. 2017;17(2):243-249. doi:10.1007/s10238-016-0413-6.
- Sehara Y, Hayashi T, Deguchi K, et al. Decreased focal inflammatory response by G-CSF may improve stroke outcome after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Res*. 2007;85(10):2167-2174. doi:10.1002/jnr.21341.
- Seifert HA, Hall AA, Chapman CB, Collier LA, Willing AE, Pennypacker KR. A transient decrease in spleen size following stroke corresponds to splenocyte release into systemic circulation. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012;7(4):1017-24. doi:10.1007/s11481-012-9406-8.
- Seok J, Warren HS, Cuenca AG, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(9):3507-3512. doi:10.1073/pnas.1222878110.

- Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:279-312. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151409.
- Serhan CN. Novel omega -- 3-derived local mediators in anti-inflammation and resolution. *Pharmacol Ther.* 2005;105(1):7-21. doi:10.1016/j.pharmthera.2004.09.002.
- Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, et al. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity.* 2003;19(6):877-89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670304>.
- Shen H, Kreisel D, Goldstein DR. Processes of sterile inflammation. *J Immunol.* 2013;191(6):2857-63. doi:10.4049/jimmunol.1301539.
- Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med.* 2009;15(8):946-950. doi:10.1038/nm.1999.
- Shyu W-C, Lin S-Z, Lee C-C, Liu DD, Li H. Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *CMAJ.* 2006;174(7):927-33. doi:10.1503/cmaj.051322.
- Simon H-U. Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis - similarities and differences. *Immunol Rev.* 2001;179(1):156-162. doi:10.1034/j.1600-065X.2001.790115.x.
- Six I, Gasan G, Mura E, Bordet R. Beneficial effect of pharmacological mobilization of bone marrow in experimental cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol.* 2003;458(3):327-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504790>.
- Solaroglu I, Cahill J, Tsubokawa T, Beskonakli E, Zhang JH. Granulocyte colony-stimulating factor protects the brain against experimental stroke via inhibition of apoptosis and inflammation. *Neurol Res.* 2009;31(2):167-72. doi:10.1179/174313209X393582.
- Sprigg N, Bath PM, Zhao L, et al. Granulocyte-colony-stimulating factor mobilizes bone marrow stem cells in patients with subacute ischemic stroke: the Stem cell Trial of recovery EnhanceMent after Stroke (STEMS) pilot randomized, controlled trial (ISRCTN 16784092). *Stroke.* 2006;37(12):2979-83. doi:10.1161/01.STR.0000248763.49831.c3.
- Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity.* 2005;22(3):285-94. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.011.
- Statistische Bundesamt, Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2014; <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>.
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.463.

- Sugiyama Y, Yagita Y, Oyama N, et al. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Enhances Arteriogenesis and Ameliorates Cerebral Damage in a Mouse Model of Ischemic Stroke. *Stroke*. 2011;42(3).
- Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, et al. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2006;203(3):505-11. doi:10.1084/jem.20050783.
- Taguchi A, Wen Z, Myojin K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model. *Eur J Neurosci*. 2007;26(1):126-33. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05640.x.
- Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(4):1167-72. doi:10.1073/pnas.1401965111.
- Thornton P, McColl BW, Greenhalgh A, Denes A, Allan SM, Rothwell NJ. Platelet interleukin-1 drives cerebrovascular inflammation. *Blood*. 2010;115(17):3632-3639. doi:10.1182/blood-2009-11-252643.
- Thorp E, Subramanian M, Tabas I. The role of macrophages and dendritic cells in the clearance of apoptotic cells in advanced atherosclerosis. *Eur J Immunol*. 2011;41(9):2515-8. doi:10.1002/eji.201141719.
- Ullrich N, Strecker J-K, Minnerup J, Schilling M. The temporo-spatial localization of polymorphonuclear cells related to the neurovascular unit after transient focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2014;1586:184-92. doi:10.1016/j.brainres.2014.08.037.
- Vaas M, Enzmann G, Perinat T, et al. Non-invasive near-infrared fluorescence imaging of the neutrophil response in a mouse model of transient cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(8):2833-2847. doi:10.1177/0271678X16676825.
- Vallières L, Sawchenko PE. Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J Neurosci*. 2003;23(12):5197-207. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12832544>.
- van Raam BJ, Drewniak A, Groenewold V, van den Berg TK, Kuijpers TW. Granulocyte colony-stimulating factor delays neutrophil apoptosis by inhibition of calpains upstream of caspase-3. *Blood*. 2008;112(5):2046-54. doi:10.1182/blood-2008-04-149575.
- Volk APD, Heise CK, Hougen JL, et al. CIC-3 and ICIswell are Required for Normal Neutrophil Chemotaxis and Shape Change. *J Biol Chem*. 2008;283(49):34315-34326. doi:10.1074/jbc.M803141200.
- Wagner D-C, Pösel C, Schulz I, et al. Allometric dose retranslation unveiled substantial immunological side effects of granulocyte colony-stimulating factor after stroke. *Stroke*. 2014;45(2):623-6. doi:10.1161/STROKEAHA.113.003812.
- Ward A, Payne KA, Caro JJ, Heuschmann PU, Kolominsky-Rabas PL. Care needs and economic consequences after acute ischemic stroke: the Erlangen Stroke Project. *Eur J Neurol*. 2005;12(4):264-7. doi:10.1111/j.1468-1331.2004.00949.x.

- Weise G, Pösel C, Möller K, et al. High-dosage granulocyte colony stimulating factor treatment alters monocyte trafficking to the brain after experimental stroke. *Brain Behav Immun.* 2017;60:15-26. doi:10.1016/j.bbi.2016.08.008.
- Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC, Rankin SM. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood.* 2008;111(1):42-9. doi:10.1182/blood-2007-07-099648.
- Wong CHY, Heit B, Kubes P. Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. *Cardiovasc Res.* 2010;86(2):183-91. doi:10.1093/cvr/cvq040.
- Wu F, Zhao Y, Jiao T, et al. CXCR2 is essential for cerebral endothelial activation and leukocyte recruitment during neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2015;12(1):98. doi:10.1186/s12974-015-0316-6.
- Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X-F, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.*
- Yang Y, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. *Brain Res.* 2015;1623:30-8. doi:10.1016/j.brainres.2015.04.024.
- Yilmaz G, Arumugam T V, Stokes KY, Granger DN. Role of T Lymphocytes and Interferon in Ischemic Stroke. *Circulation.* 2006;113(17):2105-2112. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.593046.
- Yilmaz G, Granger DN. Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurol Res.* 2008;30(8):783-93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2748428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zhao L-R, Singhal S, Duan W-M, Mehta J, Kessler JA. Brain Repair by Hematopoietic Growth Factors in a Rat Model of Stroke. *Stroke.* 2007;38(9). Available at: <http://stroke.ahajournals.org/content/38/9/2584.long>.
- Zhou W, Liesz A, Bauer H, et al. Postischemic Brain Infiltration of Leukocyte Subpopulations Differs among Murine Permanent and Transient Focal Cerebral Ischemia Models. *Brain Pathol.* 2013;23(1):34-44. doi:10.1111/j.1750-3639.2012.00614.x.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder 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. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....

Ort und Datum

.....

Unterschrift

Tabellarischer Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Sophie Cerwenka
Geburtsdatum: 29.05.1991
Geburtsort: Freudenstadt

BERUFLICHER WERDEGANG

2016 - heute Assistenzärztin für Neurologie, Klinikum Altenburger Land

THEORETISCHE AUSBILDUNG

2012 - heute Promotion, Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie
IZI Leipzig
Angestrebter Doktorgrad: Dr. med.
2009 - 2015 Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig
Staatsexamen 12/2015
2001 - 2009 Evangelisches Kreuzgymnasium, Dresden
Allgemeine Hochschulreife 06/2009
1997 - 2001 63. Grundschule Johann Gottlieb Naumann, Dresden

PRAKTIKA

2012 Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI Leipzig
2009 Medizinisch Theoretisches Zentrum, Dresden
2008 Biotechnologisches Zentrum (BioTec), Dresden

Publikationen

Cerwenka S, Pösel C, Möller K, Kranz A, Boltze J, Wagner DC, Weise G. Different doses of Granulocyte colony-stimulating factor do not impact the infiltration of polymorphnuclear neutrophils to experimental ischemic stroke. 12th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2013; Leipzig, Germany; Decembre 19, 2013.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. med. Frank Emmrich für die Möglichkeit unter seiner Doktorvaterschaft am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI Leipzig promoviert haben zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. med. Gesa Weise, die mit ihrem kritischen Blick und ihrer wertschätzenden Art die Arbeit vorantrug. Der Austausch mit ihr hat mich nicht nur fachlich sondern auch menschlich bereichert. Zudem danke Ich Herrn Dr. med. Daniel-Christoph Wagner, der das Projekt initiierte und jederzeit beratend zur Seite stand, und Herrn Professor Dr. rer. nat. Dr. med. Johannes Boltze, der zu Beginn die Arbeitsgruppe leitete und das Projekt ermöglichte.

Auch allen Mitarbeitern des Fraunhofer-Instituts für Zelltherapie und Immunologie IZI Leipzig, allen voran Herrn Dr. med. Alexander Kranz, Frau Dr. rer. nat. Claudia Pösel, Frau Dr. rer. nat. Karoline Möller und Frau Elfi Quente danke ich für die geduldige Einarbeitung sowie inspirative Hilfestellung während der Datenerhebung.

Dankbar bin ich zudem meinem Vater und Bruder für die Stärkung und den Rückhalt, wie sie nur in einer Familie herrschen können. Weiterhin danke ich meinen Freunden, die mich immer motivierten, wenn der Weg zu lang erschien. Ganz besonders möchte ich meinem Freund danken, der nicht nur an der Gestaltung der Abbildungen mitwirkte, sondern auch gemeinsame Zeit entbehren musste.