

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die exofokale postischämische neuronale Degeneration der
Substantia nigra nach striatalem Infarkt im Mausmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Maria Hetzer

aus Hannover

Datum der Promotion: 04.09.2015

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Endres

2. N.N.

3. N.N.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
1 Einleitung	5
1.1 Der ischämische Schlaganfall	5
1.2 Das experimentelle Modell der MCAo.....	11
1.3 Die exofokale post-ischämische neuronale Degeneration in der Substantia nigra.....	12
1.4 Therapeutische Intervention im Schlaganfall Modell	16
2 Zielstellung	20
3 Material und Methodik.....	21
3.1 Tiere und Tierhaltung	21
3.2 Induktion des ischämischen Schlaganfalls im Medialstromgebiet	21
3.3 Bildgebung und Auswertung.....	24
3.4 Organentnahme.....	26
3.5 Histologische Färbungen.....	26
3.6 Histologische Auswertung	27
3.7 Injektionen.....	28
3.8 Statistik	28
4 Ergebnisse	29
4.1 Versuchsprotokoll zur Charakterisierung	29
4.2 Magnetresonanztomographische Charakterisierung	30
4.3 Histologische Charakterisierung	33
4.4 Therapeutische Intervention	40
5 Diskussion	45
5.1 Interpretation der Befunde	45
5.2 Kritische Betrachtungen	55
5.3 Ausblick	57
Literaturverzeichnis.....	63
Eidesstattliche Versicherung	76
Publikationen.....	77
Anteilerklärung	78
Lebenslauf.....	79
Danksagung	80

Abkürzungsverzeichnis

ADC: Apparent Diffusion Coefficient

cCT: cerebral Computer Tomography

DAT: Dopamintransporter

DWI: Diffusion Weighted Imaging

EPND: Exofokale Postischämische Neuronale Degeneration

FK506: Tacrolimus

FOV: Field Of View

GABA: Gamma-Amino Butyric Acid

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

GP: Globus Pallidus

GPe: Globus Pallidus externus/laterale

GPI: Globus Pallidus internus/mediale

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography

i.p.: Intraperitoneal

Iba1: Ionized Calcium Binding Adaptor molecule 1

KG: Körpergewicht

MCA: Arteria Cerebri Media

MCAo: Middle Cerebral Artery occlusion

MK-801: Dizocilpin

MRT: Magnetresonanztomographie

NeuN: Neuronal Nuclei

NMDA: N-Methyl-D-Aspartat

PET: Photon-Emission Tomography

PSD: Post Stroke Depression

rtPA: Recombinant Tissue Plasminogen Activator

SN: Substantia nigra

SNc: Substantia Nigra, Pars compacta

SNr: Substantia Nigra, Pars reticularis

SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography

SPIO: Superparamagnetic Iron Oxide

SSRI: Selective Serotonin Reuptake Inhibitor

STN: Nucleus Subthalamicus

TBS: Tris Buffered Saline

TE: Time to Echo

TH: Tyrosine Hydroxylase

TR: Time to Repeat

USPIO: Ultra Superparamagnetic Iron Oxide

VP: Vascular Parkinsonism

VTA: Ventral Tegmental Area

Abstrakt

Die exofokale postischämische neuronale Degeneration (EPND) tritt in der ipsilateralen Substantia nigra nach striatalem Schlaganfall auf. In unseren Studien verwendeten wir das Fadenokklusionsmodell in der Maus (MCAo), um einen isolierten striatalen Schlaganfall zu induzieren. Wir untersuchten die dynamischen Veränderungen von neuronalen und inflammatorischen Zellen, sowie die Mechanismen der nigralen EPND. Wir applizierten FK506 bzw. MK-801 subakut, um deren anti-inflammatorischen und neuroprotektiven Effekt auf die Substantia nigra zu untersuchen.

In MRT-Messungen trat eine Mittelhirnläsion an Tag 4, 5 und 7 nach MCAo auf. Der ADC-Wert war erniedrigt, der T2-Wert erhöht. In histologischen Färbungen waren die Populationen NeuN-positiver und TH-positiver Zellen erst ab Tag 7 vermindert. Diese Reduktion blieb bis Tag 28 bestehen. Mit Hilfe der MRT-Technik kann also eine nigrale EPND antizipiert werden.

Iba1-positive Mikroglia waren in der ipsilateralen Substantia nigra im Vergleich zur kontralateralen Seite an Tag 4 bis Tag 28 erhöht, mit einem Maximum an Tag 7. Die EPND geht also mit einer zellulären inflammatorischen Reaktion einher.

Citalopram ist bisher die einzige Substanz, die bei subakuter Applikation einen neuroprotektiven Effekt auf die nigrale EPND zeigt. Zudem sind die Mechanismen, die zur EPND führen, bisher kaum verstanden. In unseren Studien untersuchten wir den Effekt des Calcineurin-Inhibitors FK506 und des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801.

Wir konnten keinen nigralen Effekt von FK506 auf NeuN-, TH- und Iba1-positive Zellen zeigen, wenn es von Tag 5 bis Tag 28 bei einer Dosierung von 1 mg/kg KG/d appliziert wird. Auch MK-801 zeigte keinen Effekt auf die nigrale Zelldichte Iba1-positiver Mikroglia bei einer Dosierung von 1 mg/kg KG/d von Tag 5 bis Tag 28. Es zeigte jedoch einen protektiven Effekt auf NeuN- und TH- positive Zellen. Dies unterstreicht die Beteiligung eines exzitotoxischen Mechanismus an der Pathogenese der EPND. Zudem stellt sich damit ein subakutes Target für anti-exzitotoxische Therapeutika dar.

Abstract

The exofocal postischemic neuronal degeneration (EPND) occurs in the ipsilateral substantia nigra following a striatal infarction. In our studies we used an established murine model (MCAo) with reperfusion after 30 minutes of occlusion to induce an isolated striatal infarction.

We examined the dynamic changes of neuronal and inflammatory cell populations, as well as the mechanisms of the nigral EPND. We applied FK506 and MK-801, respectively, to investigate their anti-inflammatory and neuroprotective effect on the substantia nigra when injected at a subacute time-point.

In the MRI a mid-brain lesion appeared on day 4, 5 and 7 after reperfusion. The ADC-value was decreased, the T2-value was increased. In histological stainings, the population of NeuN-positive and TH-positive cells were significantly decreased not until day 7 after reperfusion. The reduction of the cell density persisted at least up to 28 days after reperfusion. Using MRI, a nigral EPND can thus be anticipated.

The population of Iba1-positive microglia were increased in the ipsilateral substantia nigra from day 4 to day 28 in comparison to the contralateral hemisphere. Therefore, the EPND is accompanied by a cellular inflammatory reaction.

So far, citalopram is the only substance that shows a neuroprotective effect on the nigral EPND when applied several days after MCAo. Furthermore, the mechanisms leading to EPND, are still poorly understood. In our studies, we investigated the effect of the calcineurin-inhibitor FK506 and the NMDA-receptor-antagonist MK-801. FK506 did not have any effect on NeuN-, TH- and Iba1-positive cells after a daily application of 1 mg/kg BW/d from day 5 to day 28. Neither did MK-801 have any effect on the nigral cell density of Iba1-positive microglia when applied at 1 mg/kg BW/d from day 5 to day 28. Nonetheless, it did show a protective effect on NeuN- and TH-positive cells. This emphasizes the significance of an excitotoxic mechanism in the pathogenesis of EPND. It also presents a target for subacutely applied anti-excitotoxic substances.

1 Einleitung

1.1 Der ischämische Schlaganfall

Epidemiologie und sozioökonomische Relevanz

Nach den Statistiken der WHO gingen 2012 11,9% der weltweiten Todesfälle auf Schlaganfälle zurück. Damit stellen sie nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar (World Health Organization 2014). Neben der hohen Letalität ist insbesondere die Morbidität und Invalidisierung ein ernst zu nehmendes Problem. Jährlich erleiden allein in den USA etwa 795.000 Menschen einen Schlaganfall, dabei lagen die gesamten indirekten und direkten Kosten 2009 bei 38,6 Milliarden US-Dollar (Go et al. 2013). In Deutschland ist der Schlaganfall die dritthäufigste Todesursache, 2008 betrug die Inzidenz aller Schlaganfälle ca. 260.000 (Heuschmann et al. 2010). Die Gesamtkosten im Jahr 2004 beliefen sich dabei auf 7,1 Milliarden Euro (Kolominsky-Rabas et al. 2006), 2006 auf ca. 8 Milliarden Euro (Böhm 2009).

Der Schlaganfall tritt am häufigsten im Alter von ≥ 75 Jahren auf (European Registers of Stroke Investigators et al. 2009). Im Zuge des demographischen Wandels, das heißt einer zunehmend alternden Bevölkerung, ist daher mit einer steigenden Prävalenz und sozioökonomischen Belastung zu rechnen (Heuschmann, Neuhauser und Endres 2011).

Pathophysiologie

Etwa 80% aller Schlaganfälle sind ischämischen Ursprungs (Donnan et al. 2008). Dabei führt der Verschluss eines zerebralen Gefäßes zu einer kritischen Reduktion des zerebralen Blutflusses und damit zu einer Mangelversorgung im abhängigen Stromgebiet des betroffenen Gefäßes. In den meisten Fällen ist die Arteria Cerebri Media (MCA) betroffen; zu ca. 70% Prozent handelt es sich dabei um eine thrombembolische Ursache (Krafft et al. 2012).

Die Mangel durchblutung (=Ischämie) geht mit veränderten Stoffwechselprozessen einher, die über komplexe Schadenskaskaden zum Zelltod im betroffenen Hirngewebe (=Infarkt) führen kann (s. Abb. 1.1 und 1.2). Bei diesen Prozessen handelt es sich insbesondere um Exzitotoxizität, Peri-Infarkt-Depolarisation und oxidativen Stress, denen im Anschluss inflammatorische und apoptotische Mechanismen folgen (Dirnagl, Iadecola und Moskowitz 1999; Kunz, Dirnagl und Mergenthaler 2010; Moskowitz, Lo und Iadecola 2010).

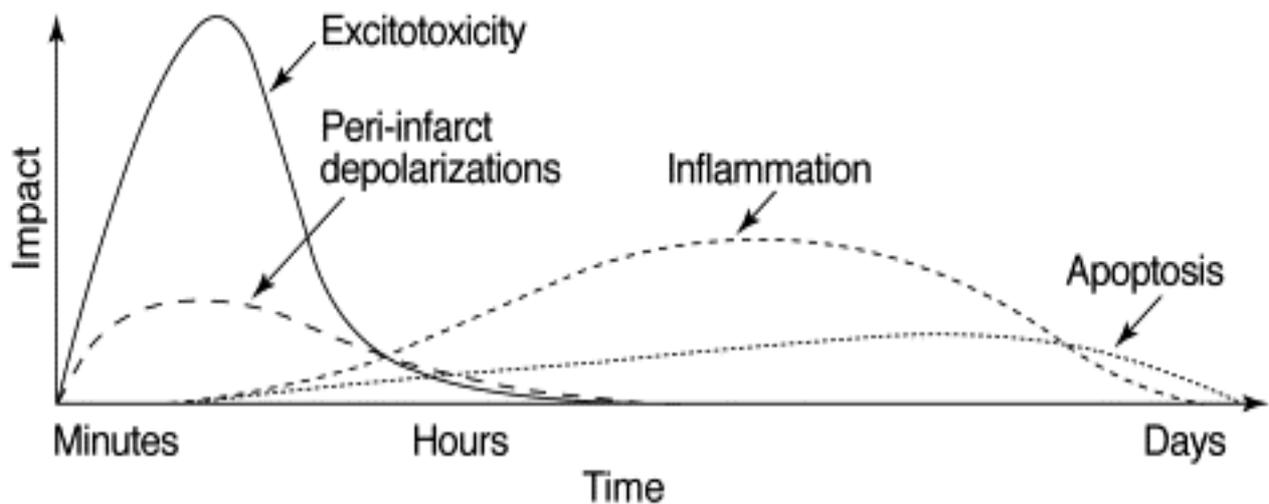


Abb. 1.1: Vereinfachte Darstellung des zeitlichen Verlaufs der wichtigsten pathophysiologischen Mechanismen nach zerebraler Ischämie (Dirnagl et al. 1999).

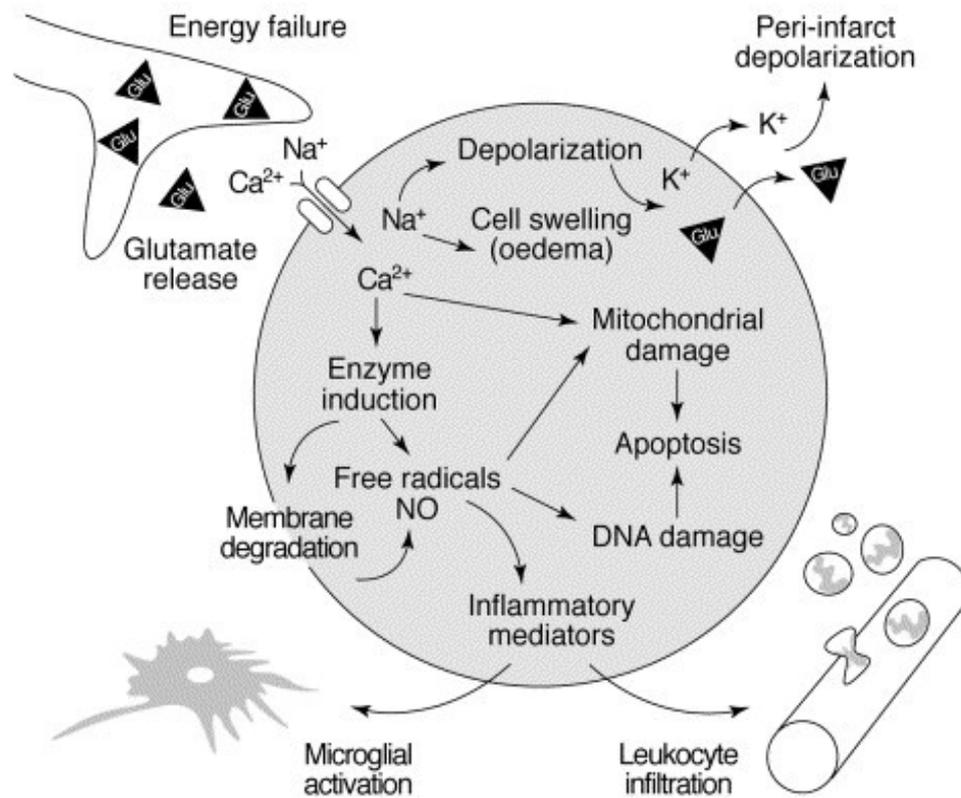


Abb. 1.2: Vereinfachte schematische Darstellung der pathophysiologischen Mechanismen nach zerebraler Ischämie in neuronalen Zellen. (Dirnagl et al. 1999).

Erreicht die Ischämie einen kritischen Wert, kommt es zu neurologischen Ausfällen, die in der klinischen Untersuchung apparent werden. In diesem Fall spricht man von einem ischämischen Schlaganfall. Die Symptomatik kann im Verlauf entweder vollständig oder teilweise regredient sein oder aber persistieren. Halten die Symptome maximal 24 Stunden an und bilden sich vollständig zurück, so wird im klinischen Gebrauch nachwievor von einer transitorisch ischämischen Attacke (TIA) gesprochen, obwohl der Begriff inzwischen sehr umstritten ist. Innerhalb von 24 Stunden kann es bereits zu Gewebsschäden kommen. Daher wurde vorgeschlagen, die Definition der TIA um das Kriterium zu erweitern, ob eine Läsion im MRT besteht oder nicht (Easton et al. 2009). Das Risiko, einen Schlaganfall mit irreversibler Symptomatik zu erleiden, ist deutlich höher nach einer

transienten Ischämie mit nachweisbarer Läsion (Giles et al. 2011). Die Deutsche Gesellschaft für Neurologie schlägt daher vor, die TIA als einen manifesten Schlaganfall anzusehen (Diener 2012). Zudem besteht in jedem Fall nach Beginn der Symptomatik ein sofortiger Handlungsbedarf (Gaul und Endres 2012; Davis und Donnan 2012).

Diagnostik

Das wichtigste diagnostische Mittel neben der klinischen Untersuchung sind bildgebende Verfahren. Diese dienen zunächst insbesondere dazu, zwischen einem ischämischen Schlaganfall und einer intrakraniellen Blutung zu unterscheiden. Dabei findet die zerebrale Computertomographie (cCT) nachwievor eine größere Anwendung, obwohl die Magnetresonanztomographie (MRT) diagnostisch überlegen ist (Davis und Donnan 2012):

Erstens ist das MRT, wie oben erwähnt, dazu geeignet, Läsionen bei transienter Symptomatik nachzuweisen (Easton et al. 2009). Zweitens kann mittels MRT das Infarktalter und damit das Zeitfenster besser eingeschätzt werden als im cCT (Röther 2001; Janjua 2012). Drittens kann im MRT zwischen irreversibel geschädigtem Gewebe und der sogenannten Penumbra differenziert werden (Mezzapesa et al. 2006; Kloska et al. 2010). Als Penumbra (griech.: Halbmond) wird dasjenige Hirngewebe bezeichnet, welches einen Infarktkern umgibt. Sie unterliegt einem reduzierten Blutfluss, der bereits zu funktionellen Ausfällen führt. Eine irreversible strukturelle Zellschädigung hat hier jedoch noch nicht stattgefunden (Heiss 2012; González 2012). Der Zustand des Penumbra-Gewebes ist damit reversibel.

Diese diagnostischen Unterscheidungen sind von entscheidender Wichtigkeit für die akuten therapeutischen Konsequenzen. Denn es gilt zunächst vor allem eine Blutung auszuschließen und reversibel geschädigtes Gewebe vor einer irreversiblen Schädigung zu bewahren. Somit hängt eine erfolgreiche Behandlung von einer frühzeitigen Diagnostik und der schnellen Entscheidung für oder gegen eine revaskularisierende Therapie ab. Der ischämische Schlaganfall ist damit auch immer ein Notfall.

Therapie

Der Fokus der Akuttherapie eines ischämischen Ereignisses liegt zum einen auf der Einschätzung einer möglichen Revaskularisierung des betroffenen Gefäßes, sowie zum anderen auf dem engmaschigen Monitoring des neurologischen Status und der Vitalfunktionen.

Die Revaskularisierung mittels Thrombolyse durch den rekombinanten Gewebefibrinolytischen Aktivator (rt-PA) ist seit 1996 in den USA und seit 2002 in Europa für den ischämischen Schlaganfall zugelassen (Wardlaw et al. 2012). Bisher gilt diese Zulassung allerdings nur für ein Zeitfenster von 3 Stunden nach Beginn der Symptomatik. In den deutschen Leitlinien ist gemäß signifikanten Befunden der ECASS 3 Studie (Hacke et al. 2008) bereits ein Zeitfenster bis 4,5 Stunden empfohlen (Diener 2012). Eine Verlängerung auf 6 Stunden (Wardlaw et al. 2012) bzw. 8 Stunden (Janjua 2012) wird aktuell diskutiert. Dennoch handelt es sich um ein sehr enges Zeitfenster. Zudem muss die Indikation der Thrombolyse streng gestellt werden. Aus diesen Gründen kommt sie letztlich in den USA bei nur weniger als 5 % der Patient*innen mit einem ischämischen Schlaganfall zum Einsatz (Kleindorfer et al. 2004; Adeoye et al. 2011).

Alternativ werden zunehmend auch endovaskuläre mechanische Rekanalisationsmethoden entwickelt und angewandt (Taqi et al. 2012). Allerdings konnte bisher keine eindeutige Überlegenheit gegenüber der systemischen Lyse mit rt-PA gezeigt werden (Zahuranec und Majersik 2012). Vor allem in der Akutphase ist eine intensivmedizinische Betreuung in einem spezialisierten Umfeld von großer Bedeutung. Es ist gezeigt worden, dass die Behandlung eines Schlaganfalls in sogenannten Stroke Units, das Outcome signifikant verbessert (Langhorne et al. 1993; Donnan et al. 2008).

Ein besonderer Fokus liegt darüber hinaus auf der Schlaganfallprävention. Dabei wird zwischen der primären und der sekundären Prävention unterschieden. Die Primärprävention hat zum Ziel, das Risiko eines initialen Schlaganfallereignisses zu reduzieren. Dies geschieht vor allem durch die Reduktion von Risikofaktoren. Dabei steht das therapeutische Management von Hypertension, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus und kardialen Störungen, wie z.B. des Vorhofflimmerns, im

Vordergrund (Endres et al. 2011).

Die Sekundärprävention dient der Risikoreduktion, einen Rezidivschlaganfall zu erleiden. Dazu zählt auch die Prävention eines Schlaganfallereignisses nach einer TIA (Rothwell, Algra und Amarenco 2011). Denn in den ersten 90 Tagen nach einer TIA ist das Risiko für weitere Ereignisse besonders hoch (Giles und Rothwell 2007). Seit 1978 haben die therapeutischen Möglichkeiten einer erfolgreichen Sekundärprävention deutlich zugenommen (Donnan et al. 2008). Bereits in der Akutphase liegt ein Fokus auf dem frühen Beginn einer Sekundärprävention. Die Wahrscheinlichkeit, einen erneuten Schlaganfall nach einem initialen Ereignis zu erleiden, ist jedoch aufgrund der heterogenen Studienlage nicht sicher zu bestimmen (Mohan et al. 2011). Die akute Sekundärprävention beinhaltet den Einsatz von Thrombozytenfunktionshemmern, die Behandlung der Hyperlipidämie, die orale Antikoagulation bei Vorhofflimmern und die Behandlung der Hypertonie (Diener 2012). Sie wird von einer Langzeitprävention unterschieden, zu der insbesondere rehabilitative Maßnahmen zählen. Trotz deutlicher Fortschritte des medikamentösen Schlaganfall-Managements liegt ein Schwerpunkt nachwievor auf dem frühen und spezifischen Beginn der Rehabilitation von funktionellen Einschränkungen. Diese betreffen meistens das motorische System und kognitive Fähigkeiten (Langhorne, Sandercock und Prasad 2009; Langhorne, Bernhardt und Kwakkel 2011).

Zusammenfassend ist der ischämische Schlaganfall von enormer epidemiologischer und sozioökonomischer Relevanz. Trotz zunehmender Forschungsaktivitäten und der Entwicklung und Verbesserung therapeutischer Strategien, stellt die Thrombolyse bisher die einzige spezifische Akuttherapie dar. Dabei ist ein frühzeitiger Beginn des Schlaganfall-Managements die Grundvoraussetzung für ein verbessertes Outcome. Bisher sind aus klinischen Studien keine Therapeutika bekannt, die bei Gabe zu einem subakuten Zeitpunkt eine neuroprotektive Wirkung zeigen. Damit besteht ein Missverhältnis zwischen der Bedeutung des ischämischen Schlaganfalls und den begrenzten Therapieoptionen, die bisher zur Verfügung stehen. Weitere Forschung ist in diesem Bereich daher unabdingbar.

1.2 Das experimentelle Modell der MCAo

Die Schlaganfallforschung stützt sich auf *in vivo* und *in vitro* Modelle. Letztere können beispielsweise die Sauerstoff- sowie die Glukosedeprievation als auch inflammatorische Aktivierungen nachstellen. Für viele Fragestellungen gibt es jedoch keine methodischen Alternativen zu tierexperimentellen *in vivo* Modellen. Dabei liegt der Fokus insbesondere auf Ratten und Mäusen, da sie vergleichsweise einfach zu handhaben sind und gut für genetische Fragestellungen geeignet sind. Außerdem liegen für Ratten und Mäuse reproduzierbare Ergebnisse in funktionellen Modellen vor. Natürlich ist jedoch die Translation von Erkenntnissen, die in Tiermodellen gewonnen wurden, auf den menschlichen Organismus nicht ohne Vorbehalt und Einschränkungen möglich.

Ein inzwischen weit verbreitetes Modell zur Erforschung des ischämischen Schlaganfalls ist die sogenannte „Middle Cerebral Artery occlusion“ (MCAo). Sie imitiert einen Verschluss der MCA, welches wie oben beschrieben die häufigste Ursache für den ischämischen Schlaganfall ist. Dabei unterscheiden sich zum einen Modelle, die einen transienten bzw. permanenten Verschluss hervorrufen. In jede dieser Kategorien fallen zum anderen wiederum verschiedene Methoden, die verwendet werden können (Liu und McCullough 2011; Krafft et al. 2012). Um einen transienten fokalen Infarkt zu modellieren, wird am häufigsten die intraluminale MCAo verwendet, welche vor bereits mehr als 20 Jahren von Koizumi et al. beschrieben worden ist (Nishigaya et al. 1991). Bei 30-minütiger Okklusion der MCA führt diese Methode zu einem reproduzierbaren isolierten striatalen Infarkt der betroffenen Hemisphäre (s. Abb. 1.3). Eine detaillierte Beschreibung folgt im methodischen Teil.

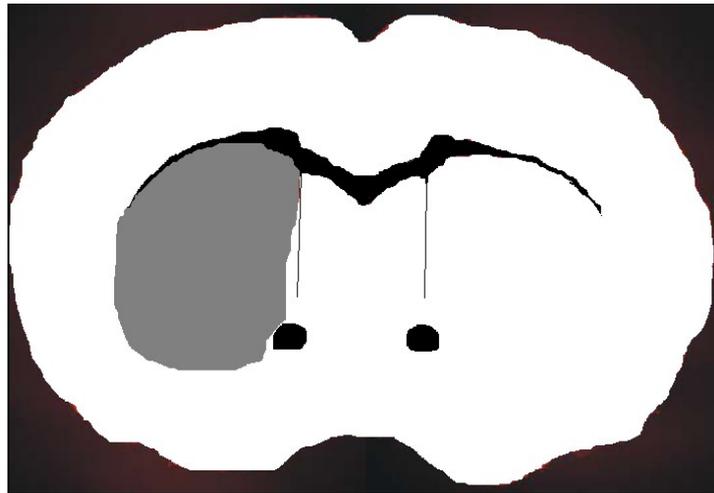


Abb. 1.3: Schematische Darstellung eines striatalen Infarkts nach 30 minütiger MCAo. Der Infarkt befindet sich in der linken Hemisphäre.

1.3 Die exofokale post-ischämische neuronale Degeneration in der Substantia nigra

Neben dem primären neuronalen Schaden im Ischämiegebiet kann es zu einer sekundären neuronalen Degeneration in Strukturen kommen, die nicht von dem betroffenen Gefäß versorgt werden, jedoch neuronale Verbindungen dahin aufweisen. Dieses Phänomen wird als exofokale postischämische neuronale Degeneration (EPND) bezeichnet (Nagasawa und Kogure 1990).

Die funktionelle Beeinträchtigung einer primär unbeschädigten Hirnregion, die jedoch über neuronale Verbindungen eng mit einem Gebiet einer primären Hirnläsion assoziiert ist, wurde 1906 erstmals als „Diaschisis“ beschrieben (von Monakow 1906). Die Art der primären Läsion ist bei dieser Beschreibung jedoch unspezifisch und die funktionellen Erscheinungen sind nicht notwendigerweise an eine permanente Zelldegeneration gebunden. Die Diaschisis geht jedoch immer mit einer Beeinträchtigung der verbindenden Nervenbahnen einher (Meyer, Obara und Muramatsu 1993). Typischerweise tritt sie später als das initiale Ereignis auf und ist damit sowohl exofokal als auch zeitlich verschoben (engl. delayed).

Bekanntermaßen führt ein isolierter striataler Infarkt zu exofokalen späten Zellveränderungen im Thalamus und Hippocampus, in der Substantia nigra und unter Umständen sogar im Rückenmark (Block, Dihné und Loos 2005). Diese Regionen stehen mit dem Striatum in enger neuronaler Verbindung, sind jedoch nicht von der Versorgung durch die MCA abhängig. Es ist bisher jedoch nur unzureichend bekannt, inwiefern diese Läsionen spezifisch für funktionelle postischämische Beschwerden verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich mit dem Phänomen der EPND befasst. Dabei stand die Assoziation zwischen einer primären striatalen Läsion nach Verschluss der MCA mit einer sekundären Läsion in der ipsilateralen Substantia nigra (SN) im Fokus der Untersuchung. Das Striatum wird von den Arteriae lenticulostriatae, Endästen der MCA, versorgt. Die SN hingegen erhält ihre Blutversorgung über die Arteria cerebri posterior. Durch die Methode der MCAo ist es nicht möglich, einen relevanten Verschluss der Arteria cerebri posterior herbeizuführen. Der zerebrale Blutfluß im Bereich der SN ist nach MCAo nicht eingeschränkt. Es gibt sogar Hinweise, dass es dort vielmehr zu einer Hyperperfusion kommt (Tamura et al. 1981). Striatum und SN stehen jedoch über ein dichtes neuronales Netzwerk in Verbindung (Benninghoff und Drenckhahn 2004).

Striatum und Substantia nigra: Anatomie und Funktion

Die SN ist eine Struktur im Mittelhirn. Sie gilt als wichtigster Syntheseort von Dopamin im Gehirn (Tritsch und Sabatini 2012). Dabei entsendet sie unter anderem dopaminerge Projektionen in das Striatum, während dieses wiederum GABAerge Neuronen in die SN projiziert (Scimeca und Badre 2012). Gemeinsam mit der SN bildet das Striatum eine wichtige funktionelle Einheit im Rahmen der extrapyramidalen motorischen Regulation. Dabei werden sie klassischerweise zu den subkortikal gelegenen Basalganglien gezählt. Außerdem steht die SN über dopaminerge Projektionen funktionell mit dem limbischen System in Verbindung (s. Abb. 1.4).

Die SN wird anatomisch in die Pars compacta (SNc) und die Pars reticularis (SNr) gegliedert. Die

SNc steht in engem Zusammenhang zur Area tegmentalis ventralis (VTA). Beide synthetisieren Dopamin. Die SNr dagegen ist eng mit dem Pallidum mediale assoziiert, welche zusammen überwiegend GABA ausschütten (Benninghoff und Drenckhahn 2004; Zhou und Lee 2011).

SNc und SNr unterscheiden sich sowohl funktionell als auch in ihrem histologischen Aufbau. Die dopaminergen Neurone der SNc erhalten vor allem GABAerge Projektionen, die zum größten Teil aus dem Striatum stammen. Sie exprimieren sowohl GABA-A als auch GABA-B-Rezeptoren. Dabei haben GABA-B-Projektionen vor allem eine modulierende Wirkung auf GABA-A Projektionen (Tepper und Lee 2007). Darüber hinaus erhält die SNc Afferenzen, die über Substanz P verfügen (Bolam und Smith 1990). Wie neue Befunde zeigen, ist auch Glutamat ein Neurotransmitter, der ausgehend vom Kortex und dem Nucleus subthalamicus die SNc erreicht (Watabe-Uchida et al. 2012).

Die Efferenzen der SNc sind dopaminerg, welche insbesondere ins Striatum projizieren. Dort werden D1 und D2 Rezeptoren unterschieden. Striatale GABAerge Neurone, welche D1 Rezeptoren exprimieren, stehen mit dem direkten Weg, D2 Rezeptoren mit dem indirekten Weg der Basalganglienschleife in Verbindung (Gerfen und Surmeier 2011).

Die SNr ist zusammen mit dem Pallidum internum die wichtigste „Outputstation“ der Basalganglien. Diese Funktion erfüllen sie über GABAerge Efferenzen. Diese Neurone wiederum erhalten ihren Input von GABAergen Projektionen aus dem Striatum und Globus pallidus einerseits und aus glutamatergen Projektionen des Nucleus subthalamicus andererseits (Zhou und Lee 2011).

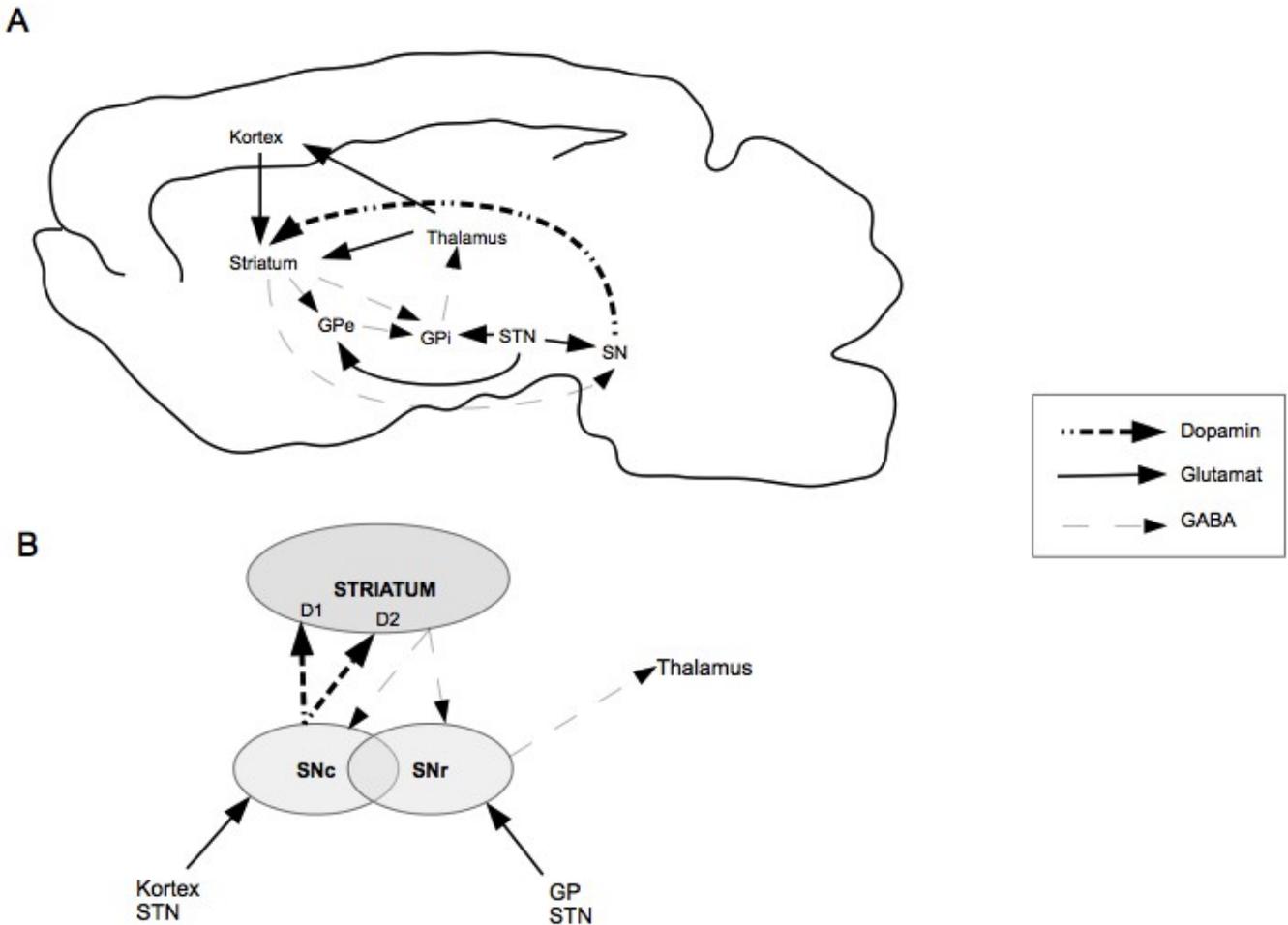


Abb. 1.4: Vereinfachte Darstellung der internukleären neuronalen Verbindungen der Basalganglienschleifen (A), sowie der afferenten und efferenten Verbindungen der SN (B). GP: Globus pallidus; Gpe: Globus pallidus externus; Gpi: Globus pallidus internus; STN: Nucleus subthalamicus; SN: Substantia nigra; SNc: Substantia nigra compacta; SNr: Substantia nigra reticularis. Vereinfachte Darstellung nach Gerfen und Surmeier 2011; Zhou und Lee 2011; Scimeca und Badre 2012.

Diese anatomischen Verbindungen verdeutlichen die Bedeutung der SN. Im Mausmodell zeigten Kronenberg et al., dass es zu einer EPND dopaminergischer Neurone in der SNc nach 30-minütiger MCAo kommt. Bei linksseitiger, jedoch nicht rechtsseitiger, MCAo entwickelten die Tiere nach 14 Wochen einen anhedonischen, ängstlichen und hilflosen Phänotyp. Dies könnte darauf hinweisen,

dass die EPND in der SN an der Entstehung der Post-Stroke Depression (PSD) ursächlich beteiligt ist (Kronenberg et al. 2012). Mit bis zu 54% ist die PSD die häufigste psychiatrische Komplikation nach ischämischem Schlaganfall und geht mit einer deutlichen Verschlechterung der Prognose einher (Kotila et al. 1998; Kronenberg, Katchanov und Endres 2006). Auch für die Ätiologie des vaskulären Parkinsonsyndroms (VP) könnte die EPND der SN von ausschlaggebender Bedeutung sein (Soriano et al. 1997). Hierbei handelt es sich um die häufigste hypokinetische Form der Bewegungsstörung nach einem Schlaganfall (Handley et al. 2009). Tierexperimentell gibt es Hinweise, dass dopamin-abhängige Bewegungsstörungen nach einem striatalen Infarkt auftreten (Borlongan et al. 1995).

Um aber zu verstehen, ob diese postischämischen Veränderungen in der SN mit funktionellen Einschränkungen einhergehen und ob sie für therapeutische Interventionen zugänglich sein könnten, sind weitere grundlegende Studien erforderlich (Zhang et al. 2012).

Zudem gibt es im Mausmodell bislang keine Studie, die sowohl den bildgebenden als auch den histopathologischen Verlauf der nigralen EPND über den Zeitraum von vier Wochen nach Reperfusion charakterisiert.

1.4 Therapeutische Intervention im Schlaganfall Modell

Kronenberg et al. konnten im Mausmodell erstmals zeigen, dass ein subakut applizierter Selektiver Serotonin-Reuptake-Inhibitor (SSRI) nach MCAo einen neuroprotektiven Effekt auf die EPND in der ipsilateralen SN zeigt. Zudem zeigte sich in ihren Studien ein verbessertes funktionelles Outcome (Kronenberg et al. 2012).

Weitere subakut wirksame Neuroprotektiva sind für das Phänomen der EPND in der SN bisher nicht bekannt. Dies mag auch an einem noch unzureichenden Verständnis der Mechanismen der EPND liegen. In einem Review von 2005 stellten Block, Dihné und Loos die Bedeutung sowohl

eines exzitatorischen als auch eines inflammatorischen Mechanismus für die EPND in der SN heraus (Block, Dihn , and Loos 2005).

Vielversprechende Substanzen, die in diese Mechanismen jeweils eingreifen, sind zum einen das Anti-Inflammativum Tacrolimus (FK506) sowie das anti-exzitotoxisch wirksame Dizocilpin (MK-801). Genauer handelt es sich (1) bei FK506 um einen Calcineurin-Inhibitor und (2) bei MK-801 um einen NMDA-Rezeptor-Antagonist.

(1) Ein inflammatorisches Geschehen findet im Bereich der primären ischämischen Läsion statt. Ob die postischämische Inflammation eine sch diggende oder eine protektive Wirkung hat, ist nicht eindeutig. Dirnagl beschreibt diese Ambivalenz als sog. Janus-Effekt (Dirnagl 2004). Der Effekt hängt zum einen von dem Zeitpunkt nach Ischämie ab (Amantea et al. 2009), zum anderen davon, um welche Komponente des Immunsystem es sich handelt. Es werden in der Regel zelluläre Bestandteile (z.B. Mikroglia, Astrozyten, Lymphozyten, Makrophagen) von löslichen Zytokinen (z.B. Il-1, Il-6, TNF ) unterschieden (Stoll, Jander und Schroeter 1998; Lambertsen, Biber und Finsen 2012).

Auch in sekundären Läsionen finden sich deutliche Hinweise auf eine Beteiligung von Mikroglia und Astrozyten sowie inflammatorische Zytokine, insbesondere TNF-  und IL-6 (Block, Dihn , und Loos 2005). Eine Aktivierung von Mikroglia in der SN wurde im Rattenmodell am Tag 3 und Tag 7 nach striataler Ischämie beobachtet; GFAP-positive Astrozyten treten hingegen erst am Tag 7 auf (Dihn  und Block 2001; Loos, Dihn  und Block 2003). Ab Tag 3 tritt zudem eine Erhöhung des Zytokins TNF  auf (Loos, Dihn  und Block 2003). Es gibt Hinweise, dass TNF  an der Neurodegeneration beteiligt ist (Block et al. 2004). Il-6 hingegen, welches an Tag 3 und Tag 7 erhöht auftritt, scheint einen neuroprotektiven Effekt zu haben (Dihn  und Block 2001; Suzuki et al. 1999; Suzuki, Tanaka und Suzuki 2009). Gertz et al. konnten zeigen, dass eine Hochregulierung von Il-6 nach Infarkt die Angiogenese im betroffenen Gebiet fördert, und somit einen positiven Langzeiteffekt aufweist (Gertz et al. 2012).

Tacrolimus (FK506) ist ein etabliertes Immunsuppressivum aus der Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren. Damit greift es vor allem in die Aktivierung von T-Zellen ein und somit in die

Freisetzung von Zytokinen. Klinische Anwendung findet es dabei bisher vor allem in der Transplantationsmedizin (Macleod et al. 2005).

(2) Exzitotoxische Mechanismen spielen in der primären Ischämielesion bekanntermaßen eine entscheidende Rolle: durch die Mangelversorgung kommt es zu einer Dysregulation der Membranpotentiale und damit zu einem Glutamat- und Calciumüberschuss, was schließlich zu einem Zellödem und zum Zelluntergang führt (Dirnagl, Iadecola und Moskowitz 1999; Moskowitz, Lo und Iadecola 2010).

Auch in der sekundären Läsion finden sich Hinweise auf eine Beteiligung exzitotoxischer Schädigung. Untersuchungen mit anti-exzitotoxischen Substanzen führten zu einer verminderten neuronalen Degeneration in der SN (Saji und Reis 1987; Saji et al. 1994; Saji, Blau und Volpe 1996).

Sowohl Tacrolimus als auch Dizocilpin zeigten im Tierexperiment bei akuter Gabe nach primärer Ischämie eine protektive Wirkung. Und auch in der sekundären Läsion konnte ein verminderter neuronaler Zellverlust nach akuter Gabe der jeweiligen Substanz gezeigt werden. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass der Effekt auf die sekundäre Läsion nicht ohne Weiteres unabhängig von dem Effekt auf die primäre Läsion betrachtet werden kann.

Für die subakute Gabe dieser Substanzen gibt es bisher keine Untersuchungen. Wir wählten für unsere Untersuchungen als Beginn der Applikation einen deutlich späteren Zeitpunkt als in bisher veröffentlichten Studien. Erst, wenn bereits magnetresonanztomographische Veränderungen im Bereich der SN sichtbar würden, sollte die therapeutische Intervention mit FK506 bzw. MK-801 beginnen.

Zusammenfassend sollte in den vorliegenden Studien die EPND in der SN nach striataler Ischämie im Mausmodell sowohl magnetresonanztomographisch als auch histologisch charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte zur Exploration zugrunde liegender Mechanismen untersucht werden, ob das etablierte antiinflammatorische Neuroprotektivum Tacrolimus sowie Dizocilpin, das

primär über einen anti-exzitotoxischen Mechanismus wirkt, einen neuroprotektiven Effekt auf die EPND zeigen. Die Applikation begann erst bei sichtbarer magnetresonanztomographischer Veränderung, um zu untersuchen, ob sie insbesondere nach spätem Applikationszeitpunkt einen neuroprotektiven Effekt zeigen.

Zur Bearbeitung der Fragestellungen wurden folgende Experimente durchgeführt: Erstens wurde eine Gruppe (n=10) von männlichen SV-Mäusen an Tag 1, 4, 5, 7, 14, 21 und 28 nach 30-minütiger MCAo mittels T2- und DWI-Sequenz im MRT gemessen. Zweitens wurde jeweils eine Gruppe (n=10) von männlichen SV-Mäusen an Tag 4, 7, 14 und 28 nach 30-minütiger MCAo histologisch auf NeuN-, TH- und Iba1- positive Zellen in der SN untersucht. Drittens erhielt jeweils eine Gruppe (n=10) von Tag 5 bis Tag 28 nach 30-minütiger MCAo entweder 1 mg/kg KG MK-801 i.p. oder 1 mg/kg KG FK506 i.p.; die jeweiligen Kontrollgruppen erhielten dabei das Vehikel.

2 Zielstellung

Ein primärer ischämischer Infarkt im Striatum kann zur sekundären exofokalen postischämischen neuronalen Degeneration (EPND) in der ipsilateralen SN führen. Obwohl es gute Hinweise gibt, dass die EPND in der SN an funktionellen Schädigungen ursächlich beteiligt ist, sind die Mechanismen bisher unklar. Die folgenden Untersuchungen sollten zum einen dazu dienen, den dynamischen Verlauf der EPND über 28 Tage nach 30-minütiger MCAo im Mausmodell zu charakterisieren: (1) Bildgebend sollten die magnetresonanztomographischen Veränderungen im Mittelhirn in T2- und DWI-Wichtung dargestellt werden. (2) Histopathologisch sollten die Veränderungen von neuronalen, dopaminergen und inflammatorischen Zellpopulationen in der SN untersucht werden. Dabei stand insbesondere die Frage im Fokus, ob die bildgebenden Verfahren eine neuronale Degeneration in der SN antizipieren könnten, d.h. bereits vor einer tatsächlichen Veränderung die sekundäre Schädigung feststellen können. Zum anderen sollte (3) nach dem Auftreten einer bildgebenden Veränderung der Effekt einer subakuten therapeutischen Intervention mit der anti-exzitotoxischen Substanz MK-801 und der anti-inflammatorischen Substanz FK506 auf die EPND in der SN exploriert werden.

3 Material und Methodik

3.1 Tiere und Tierhaltung

Alle Tierexperimente wurden unter strenger Einhaltung der gesetzlichen Tierschutzrichtlinien durchgeführt und sind im Tierversuchsvorhaben G0383/09 am 08.03.2010 vom Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt worden.

Für die Versuche wurden männliche SV129 Wildtypmäuse (8 – 12 Wochen alt) des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) Berlin verwendet. Während der gesamten Experimentdauer von bis zu 28 Tagen hatten alle Tiere ad libitum Zugriff auf Futter und Wasser. Der Tag-Nacht-Rhythmus war durch alternierende Lichtverhältnisse standardisiert, wobei die Tagphase von 07:00 Uhr bis 19:00 Uhr dauerte. Die Raumtemperatur wurde bei $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ und die Luftfeuchtigkeit bei 50% gehalten. Den Tieren wurde jeweils mindestens eine Woche vor Experimentbeginn eine Gewöhnungsphase an die neue Umgebung eingeräumt.

3.2 Induktion des ischämischen Schlaganfalls im Medialstromgebiet

Das folgende operative Verfahren wurde mittels geeigneter Operationsinstrumente von Fine-Science-Tools® durchgeführt. Es wurde das sog. Fadenokklusions-Modell verwendet, um einen ischämischen Schlaganfall im Versorgungsgebiet der linken Arteria cerebri media zu induzieren (MCAo) (Endres und Dirnagl 2002). Dabei ermöglicht das Modell, die Ischämiezeit genau zu kontrollieren. Insbesondere das Modell der 30-minütigen transienten Ischämie ist in der Arbeitsgruppe Endres sehr gut etabliert (s. Abb. 3.1). Durch die Reperfusion nach 30 Minuten wird ein isolierter primärer Infarkt des ipsilateralen Striatums hervorgerufen (Katchanov et al. 2003; Winter et al. 2004).

Der Eingriff zur Provokation der Ischämie dauerte jeweils weniger als 10 Minuten, der Eingriff zur

Herstellung der Reperfusion weniger als 5 Minuten. Während beider Eingriffe wurde das Tier mittels einer Inhalationsnarkose anästhesiert. Das Gasmischung wurde über eine Maske zugeführt. Die Tiere atmeten spontan. Die Narkose wurde mit 1,5 bis 2% Isofluran in 70% N₂O und 30% O₂ mittels eines Vaporisators induziert und bei 1% Isofluran durchgeführt. Während der Ischämiezeit wurde das Tier ohne Narkose in einen Wärmekäfig gelegt, um eine zu lange Narkosezeit zu verhindern.

Die Körpertemperatur der Tiere wurde während der Operation über eine rektale Temperatursonde und einem sich anschließenden Rückkopplungssystem auf einem Wärmekissen bei 37°±0,5°C konstant gehalten.

Die Tiere wurden während der OP auf dem Rücken gelagert und fixiert. Zu Beginn der OP wurde durch einen medianen Hautschnitt der Halsbereich der Maus eröffnet, dann wurde die paarige Schilddrüse stumpf dargestellt, um eine freie Sicht auf die Trachea zu gewährleisten. Durch die Entfernung von Binde- und Fettgewebe erfolgte die Darstellung der Arteria carotis communis, Arteria carotis externa und Arteria carotis interna sowie der Karotisbifurkation. Zuerst wurde vorsichtig der mit der Arteria carotis communis kranial verlaufende Nervus vagus stumpf vom Gefäß getrennt, um die Arterie danach proximal mit einer Gefäßligatur zu verschließen. Ebenso wurde die Arteria carotis externa mittels einer Ligatur verschlossen. An der Arteria carotis interna wurde dann eine Ligatur vorbereitet. Distal der vorbereiteten Gefäßligatur wurde ein Mikrogefäßclip angebracht. Anschließend wurde die Arteria carotis communis proximal der Karotisbifurkation und distal der verschließenden Gefäßligatur eingeschnitten. Über diese Öffnung wurde das Filament, ein silikonbeschichteter, 11 mm langer, 0,5 mm durchmessender Seidenfaden 8.0 (Suprama, Germany) in die Arteria carotis interna eingeführt.

Das Filament wurde dabei zunächst nur bis zu dem feststehenden Gefäßclip in die Arterie vorgeschoben. Danach wurde der Gefäßclip geöffnet und zeitgleich das schon vorplatzierte Filament weiter in die Arteria carotis interna vorgeführt. Dabei musste unter Sichtkontrolle darauf geachtet werden, dass das Filament nicht fälschlicherweise in der Arteria pterygopalatina, die weiter distal ebenfalls aus der Arteria carotis interna entspringt, zu liegen kommt. Im Anschluss wurde die Arteria carotis interna legiert, um das Filament in seiner Position zu fixieren.

Die Spitze des Filaments befand sich nun bei regelrechter Operation im A1-Segment der Arteria cerebri anterior und verlegte damit das M1-Segment der Arteria cerebri media und die Arteria choroideae anteriores. Es entstand somit eine Ischämie im Medialstromgebiet, jedoch nicht im Anteriorstromgebiet. Der regionale Blutstrom wurde mittels einer flexiblen Sonde und einem Laser-Doppler (Perimed, Sweden) gemonitort.

Der Hautverschluss erfolgte mittels Einzelstichnaht, die anschließend zum Reperfusionseingriff wieder geöffnet werden konnte.

Nach 30-minütiger Ischämiezeit wurden die Tiere erneut kurz anästhesiert, um das okkludierte Gefäß zu reperfundieren. Dazu wurde die Ligatur über der Arteria carotis interna geöffnet, das Filament entfernt und dieselbe Ligatur wieder zugezogen.

Um den postoperativen Wundschmerz im Gebiet des Hautschnitts am Hals zu minimieren, wurde vor der finalen Hautnaht ein Xylocaingel (Xylocain® 2%, AstraZeneca GmbH) in die Wunde eingebracht.

Nach dem Eingriff verblieben die Tiere für weitere zwei Stunden im Wärmekäfig, bevor sie zurück in den Tierstall gebracht wurden.

Das neurologische Defizit wurde anhand der Bederson-Kriterien (Bederson) zu den Zeitpunkten 30 Minuten und 24h nach Einsetzen der Ischämie bestimmt (0=kein Defizit, 1=leichtes Defizit, 2=mäßiges Defizit, 3=schweres Defizit) (Bederson et al. 1986).

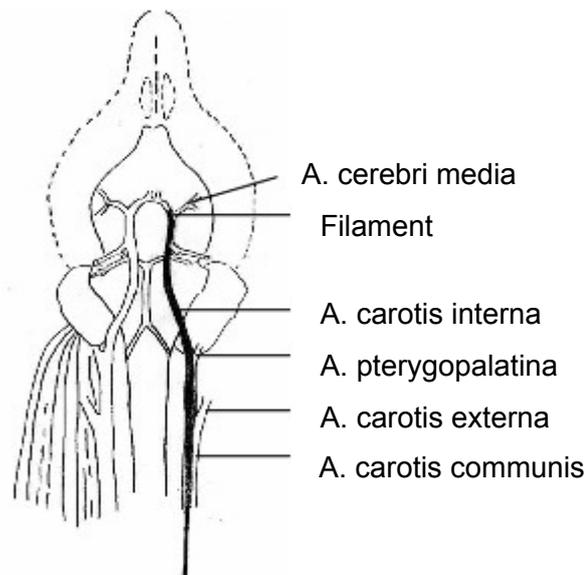


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der anatomischen Verhältnisse bei der intraluminalen MCAo im Gefäßsystem der Maus (Ansicht von unten).

3.3 Bildgebung und Auswertung

Die MRT-Messungen wurden an einem Bruker 7 Tesla Scanner (70 / 16AS, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) mit einem 16 cm durchmessenden Magneten und einem 9 cm abgeschirmten Gradienten mit einer H-resonance-frequency von 300 MHz und einer maximalen Gradientenstärke von 300 mT/m durchgeführt. Es wurden sowohl eine Mauskopfspule (Bruker, 20 mm, RF coil) als auch eine Oberflächenspule (Bruker, 72-mm-Volumenresonator zur Transmission und eine 1H-Phased-Array surface coil) verwendet. Die Daten wurden mit der Software Paravision 4.0 prozessiert.

Während der Untersuchung wurden die Tiere auf einem MRT-kompatiblen Heizkissen platziert, um ihre Körpertemperatur bei 37°C konstant zu halten. Sie wurden zu Beginn mit 3% und zur Aufrechterhaltung mit 1,5-2% Isofluran (Forene, Abbot, Wiesbaden, Germany) anästhesiert. Das Isofluran wurde in einem Sauerstoff/Stickstoff-Gemisch mittels einer Beatmungsapparatur

zugeführt. Dabei wurde die Atmung während des gesamten Messvorgangs monitorisiert (Small Animal Monitoring & Gating System, SA Instruments, Stony Brook, New York, USA), um die Inhalationsnarkose ggf. anzupassen. Die Untersuchungszeit für eine Maus inklusive Lagerung im und Herausnehmen aus dem MRT-Gerät betrug ca. 15 min bei alleiniger T2-Messung und ca. 45 min bei zusätzlicher T2-map- und DWI-Messung.

Zur Bildgebung wurden die T2-, T2map und DWI-Sequenz angewandt mit den entsprechenden Einstellungen:

T2-Sequenz: TR: 4059 ms; TE: 36 ms; RARE factor 8; 4 averages; 35 axial slices; slice thickness: 0.5 mm; FOV: 2.85 x 2.85 cm; matrix: 256 x 256.

T2map: TR: 2000 ms; TE: 20 ms; 2 averages; 5 slices ; slice thickness: 0,5 mm; FOV: 2,50 x 2,50 cm; matrix 256 x 256.

DWI: TR: 3000 ms; TE: 35 ms; 1 average; 5 slices; slice thickness: 1 mm; FOV 2,80 x 2,80 cm; matrix 128 x 128; 1 diffusion direction; diffusion duration: 7 ms; diffusion separation: 14 ms; max b value: 3263,5 s/mm²; b value per direction: 0 - 1300 s/mm².

Die T2-Messung wurde auf das gesamte Mausgehirn von Bulbus olfactorius bis zum Zerebellum angewandt, zum einen zur Quantifizierung des Schlaganfallvolumens 24h nach MCAo, zum anderen zur Lokalisierung der Substantia nigra im Mesencephalon an den nachfolgenden Zeitpunkten nach MCAo. Die DWI- und T2map-Sequenzen wurde ausschließlich auf die Region des Mittelhirns angewandt.

Die volumetrische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms Analyze 5.0 (AnalyzeDirect, Inc.; Lenexa USA). Die Auswertung der DWI- und T2map- Bilder zur Berechnung des respektiven ADC- und T2-Wertes erfolgte mithilfe entsprechender Matlab-Scripte.

Die Anzahl der Tiere, die für die quantitative MRT-Analyse verwendet werden konnte, variiert. Dies liegt an Bewegungsartefakten, die eine genaue Messung verhinderten. Wir gehen nicht davon aus, dass diese zufälligen Artefakte einen systematischen Bias unserer Daten hervorgerufen haben.

3.4 Organentnahme

Zur Organgewinnung wurden die Tiere zunächst mit einer Überdosis Thiopental (Thiopental Inresa als 0,5 g Trockensubstanz mit dem Wirkstoff Thiopental-Natrium bei 4°C gelagert) narkotisiert, um sie anschließend transkardial mit 20 ml NaCl (0,9%) und 20 ml Paraformaldehyd (4% in 0,1 mol/l Phosphatpuffer) zu perfundieren. Daraufhin wurde das entsprechende Tier dekapitiert und das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel präpariert. Dieses wurde zunächst über 48h bei 4°C in Paraformaldehyd postfixiert und danach in Saccharose (30% in 0,1 mol/l Phosphatpuffer) zur Dehydratation des Gewebes gelagert.

3.5 Histologische Färbungen

Die Gehirne wurden jeweils auf einem von Trockeneis gekühlten Block fixiert und mit einem Mikrotom (Leica, Bensheim, Deutschland) in 40 µm dicke Koronarschnitte in jeweils 240 µm Abstand bzw. 480 µm Abstand kryotomiert. Die Schnitte wurden daraufhin bei -20°C in einer kryoprotektiven Lösung (25% Ethylenglykol, 25% Glycerin, 0,05 ml/l Phosphatpuffer) gelagert. Die Schnitte wurden dann immunhistochemisch in einer Lösung aus TBS, 3% Donkey Serum, 0,1% Triton X-100 und entsprechendem Antikörper gefärbt (Gertz et al. 2006; Katchanov et al. 2001). Die primären Antikörper waren jeweils: mouse anti-NeuN (1:100, Chemicon), polyclonal rabbit anti-Iba1 (1:500; Wako, Neuss, Deutschland), sowie anti-TH (1:200, Abcam). Als sekundärer Antikörper wurde Donkey-Anti-Rabbit Biotin (1:125, Dianova 711-065-152) verwendet.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden in Kooperation mit Prof. Golo Kronenberg durchgeführt.

3.6 Histologische Auswertung

Substantia nigra

Im Bereich der Substantia nigra (Bregma – 2.80 bis -3.64) wurden jeweils die NeuN-, die TH-, sowie die Iba1-positiven Zellen quantifiziert. Dazu diente eine Stereoinvestigator Plattform (Microbrightfield, Williston, Vermont) in Verbund mit einem Leica DMRA Mikroskop (Bensheim, Germany), sowie eine Stereoinvestigator Software (Microbrightfield Europe, Magdeburg, Germany).

Auf jeweils 1 bis 3 Koronarschnitten wurde sowohl kontralateral als auch ipsilateral das Gebiet der SN umrandet, wodurch sich ein Wert der Fläche ergab. Dabei wurde eine niedrige Vergrößerung (x5) verwendet. Innerhalb dieser Umrandungen wurden bei hoher Vergrößerung (x20) alle Zellen, die jeweils NeuN-, TH- oder Iba1-positiv waren, ausgezählt.

Striatum

Die Quantifizierung der NeuN-positiven Zellen im Striatum derjenigen Tiere, die mit MK-801 oder FK506 oder Vehikel behandelt worden waren, erfolgte stereologisch. Dazu diente dieselbe Apparatur wie bei der SN-Quantifizierung (s.o.). Auf jeweils 6 Koronarschnitten (40 µm), die sich im Intervall von 240 µm (=6x40 µm) befanden, wurde sowohl das ipsilaterale als auch das kontralaterale Striatum des jeweiligen Tieres (Bregma 1.42 mm und -0.46 mm) ausgewertet. Für die ipsilaterale Seite wurde ein Counting Frame width (x) und height (y) von jeweils 40 µm verwendet. Die Sampling Grid betrug sowohl in der x- als auch in der y-Achse 150 µm. Auch für die kontralaterale Seite wurde ein Counting Frame von 40 µm x 40 µm gewählt. Die Sampling Grid war hier weitmaschiger mit 300 µm x 300 µm.

3.7 Injektionen

Einhundertundzwanzig Stunden (5 Tage) nach MCAo wurde die Behandlung mit FK506 bzw. mit MK-801, welche beide bluthirnschrankengängig sind, begonnen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tiere ein Gewicht von 15-30g. Das jeweilige Pharmakon wurde der behandelten Gruppe intraperitoneal appliziert. Der Kontrollgruppe wurde die Trägersubstanz (NaCl 0,9%) appliziert. Diese Behandlung wurde täglich bis Tag 28 durchgeführt.

FK506 (Tacrolimus)

Es wurde Prograf® von Astellas-Pharma Germany, 5 mg/ml Konzentrat pro Ampulle à 1 ml, verwendet. Die Therapiegruppe erhielt von Tag 5 bis Tag 28 nach MCAo intraperitoneal täglich 1 mg/kg KG FK506 gelöst in 0,9% NaCl. Das Pharmakon wurde bei 4°C gelagert.

MK-801 (Dizocilpin)

Es wurde (+)-MK-801hydrogen maleate von Sigma Aldrich Germany (Nr.: M107-50MG), 50 mg Trockensubstanz, verwendet. Die Therapiegruppe erhielt von Tag 5 bis Tag 28 nach MCAo i.p. täglich 1 mg/kg KG MK-801 gelöst in 0,9% NaCl. Das Pharmakon wurde bei 4°C gelagert.

3.8 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler erhoben. Zur statistischen Auswertung des Unterschieds zwischen zwei normalverteilten Gruppen wurde der unabhängige t-Test oder bei nicht normalverteilten Gruppen der Mann Whitney U Test verwendet. Beim MRT-Verlauf wurde der repeated ANOVA angewendet. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsprotokoll zur Charakterisierung

Insgesamt wurden 5 Gruppen von Tieren (jeweils n=10) für die Charakterisierung des dynamischen Verlaufs verwendet. Alle Tiere wurden am Tag 0 wie oben dargestellt operiert. Die jeweils kontralaterale Hemisphäre diente als Kontrolle. An allen Gruppen wurde eine T2-MRT-Messung an Tag 1 postischämisch durchgeführt, um das Vorhandensein und die Größe des striatalen Infarkts nachzuweisen. An Tag 4, 5, 7, 14, 21 und 28 wurde in einer Gruppe zusätzlich eine DWI- und T2-map-Messung durchgeführt, um den ADC- und T2-Wert zu erhalten. An Tag 4, 7, 14, und 28 wurden die Hirne einer jeweils anderen Gruppe für die weitere histologische Auswertung gewonnen (s. Abb. 4.1).

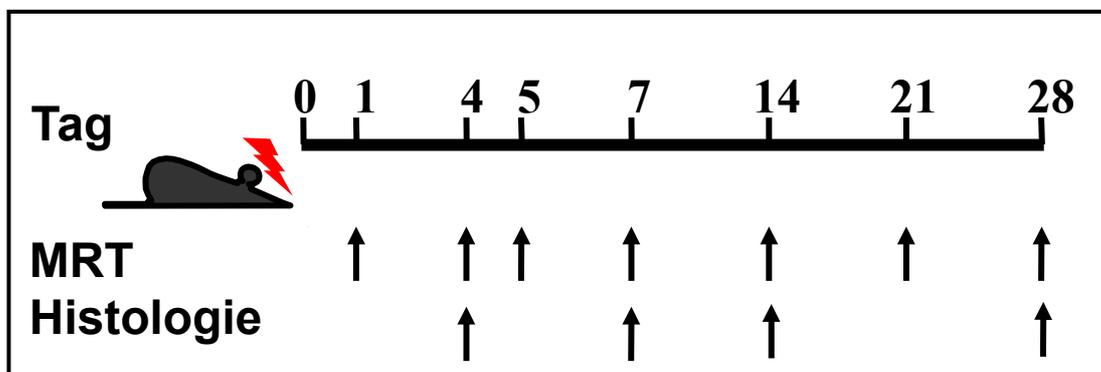


Abb. 4.1: Protokoll für die Charakterisierung des dynamischen Verlaufs. Die MCAO erfolgte an Tag 0; T2 MRT-Messungen an Tag 1; T2, T2-map, DWI-Messungen an Tag 4, 5, 7, 14, 21 bzw. 28; die Organgewinnung bzw. der Endpunkt erfolgte in jeweils einer Gruppe an Tag 4, 7, 14, 28.

4.2 Magnetresonanztomographische Charakterisierung

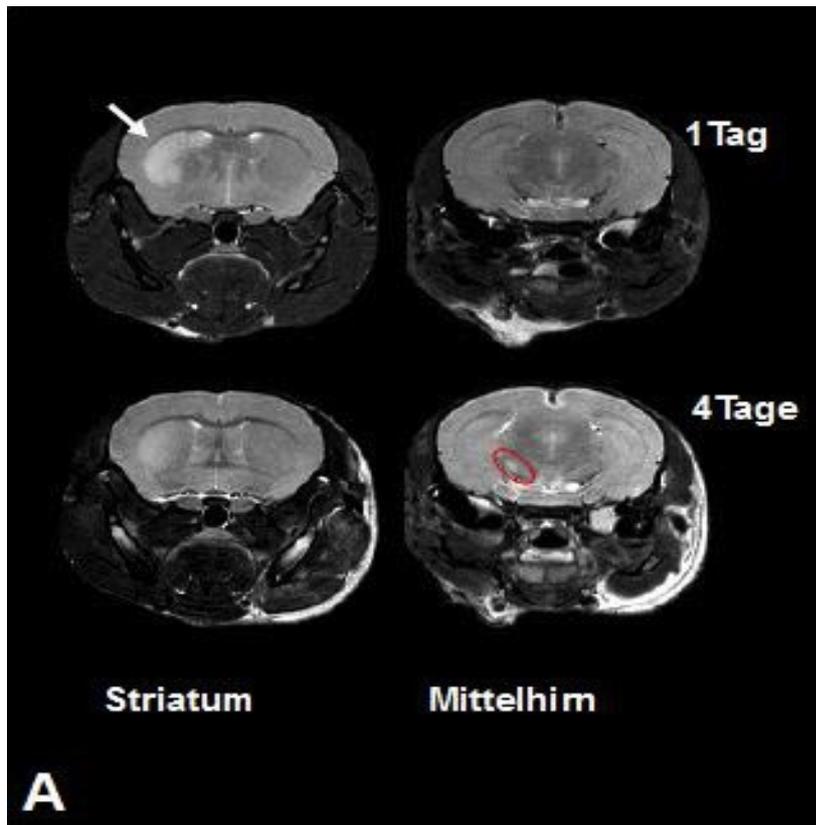
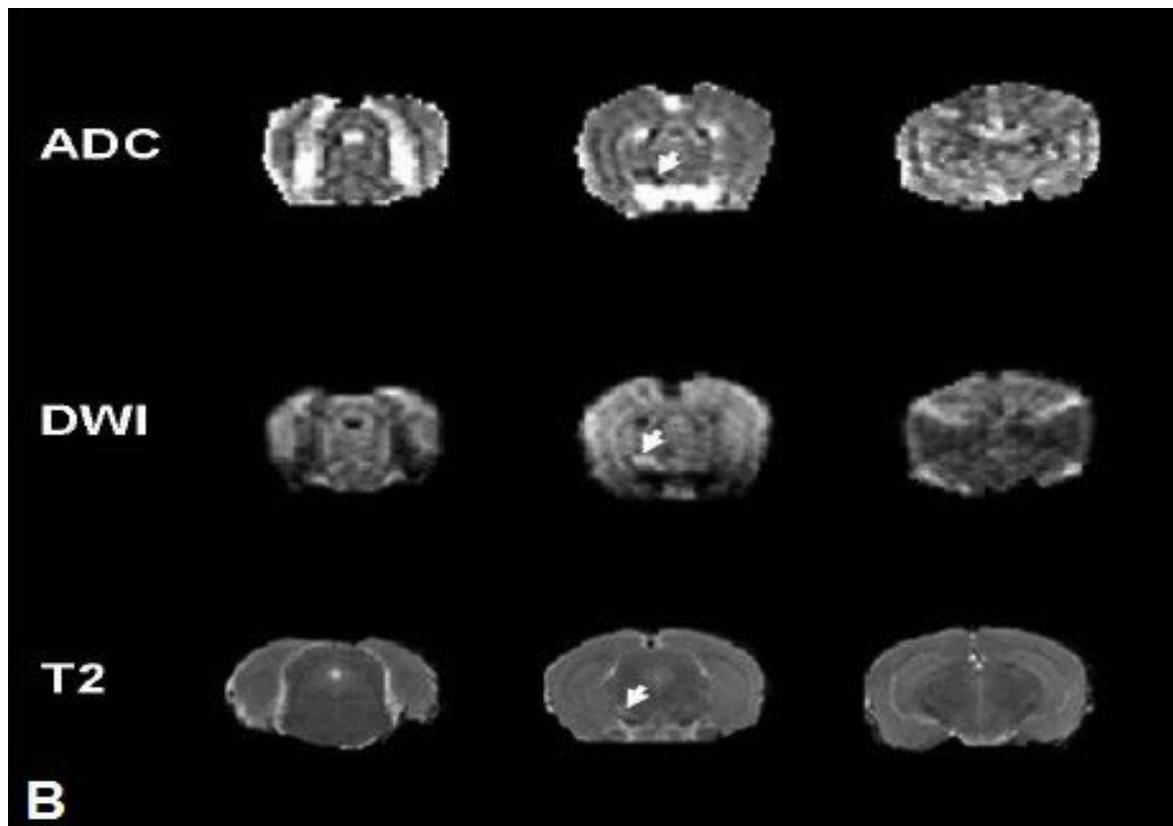


Abb 4.2:

(A) Repräsentatives MRT in T2-Sequenz des Striatums und Mittelhirns. An Tag 1 zeigt sich eine Hyperintensität nur im ipsilateralen Striatum (Pfeil), an Tag 4 sowohl im Striatum als auch in der ipsilateralen SN (rot). (B) Die ipsilaterale SN zeigt in der DWI einen erniedrigten ADC, in der T2-map-Sequenz eine Hyperintensität (Pfeile).



Eine Gruppe männlicher SV-Mäuse (n=10) wurde nach 30-minütiger MCAo reperfundiert und am Tag 1, 4, 5, 7, 14, 21 und 28 postoperativ magnetresonanztomographisch gemessen. Dabei interessierte vor allem, ob Tiere mit einem linkshemisphäriellen striatalen Infarkt Veränderungen in der ipsilateralen SN aufweisen. Weiterhin interessierte, wann die Veränderungen auftreten und wie lange diese bestehen. Alle Tiere, die im Verlauf weiterbeobachtet wurden, zeigten einen ipsilateralen striatalen Infarkt (s. Abb. 4.2). In der SN-Region zeigte sich am ersten Tag weder in der T2- gewichteten noch in der DWI-Messung ein Unterschied zwischen der ipsilateralen und der kontralateralen Seite. An Tag 4 wurde bei allen Tieren im Bereich der ipsilateralen SN in den jeweiligen T2- und in den DWI-Messungen eine Hyperintensität sichtbar.

Hierbei zeigte sich quantitativ ein signifikanter Unterschied zwischen der ipsilateralen und der kontralateralen SN. Der T2-Wert war an Tag 4 mit $33,1 \pm 2,4$ ms ipsilateral im Vergleich zu $28,0 \pm 1,6$ ms kontralateral signifikant erhöht ($p < 0,05$), der ADC-Wert mit $4,8 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ mm²/s ipsilateral im Vergleich zu $6,3 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ mm²/s kontralateral erniedrigt ($p < 0,001$). Auch an Tag 5 und Tag 7 konnten diese Unterschiede zwischen der ipsilateralen und der kontralateralen SN in signifikantem Maß verzeichnet werden (s. Abb. 4.3 und Abb. 4.4).

Zu allen späteren Zeitpunkten, also an Tag 14, 21 und 28 stellte sich qualitativ keine Hyperintensität dar. Es zeigte sich in der quantitativen Auswertung weder eine signifikante Erhöhung des T2-Werts, noch eine signifikante Erniedrigung des ADC-Werts. Aufgrund einer Normalisierung des T2-Werts an Tag 21, erfolgte zum Zeitpunkt 28 keine erneute T2-Map Messung. Dadurch wurde die Messzeit und somit die Belastung der Tiere reduziert.

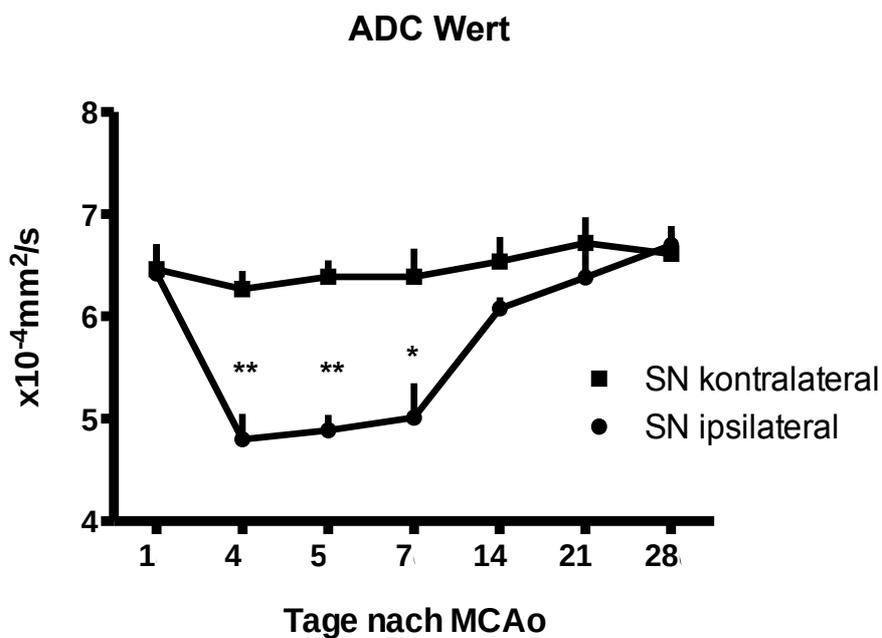


Abb. 4.3: Veränderung des ADC-Werts in der ipsilateralen SN über einen zeitlichen Verlauf von 28 Tagen nach striatalem ischämischem Infarkt. An Tag 4, 5 und 7 nach Reperfusion war der ADC-Wert in der ipsilateralen SN signifikant niedriger im Vergleich zur kontralateralen SN, n=5-9 Tiere, Werte in mean ± SEM, **p<0.001, *p<0.05.

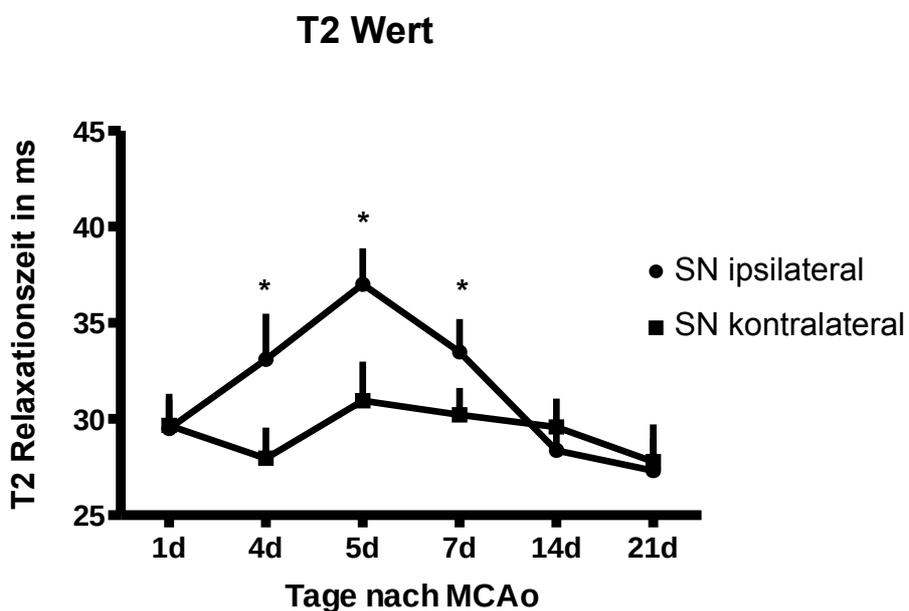


Abb. 4.4: Veränderung des T2-Werts in der ipsilateralen SN über einen zeitlichen Verlauf von 28 Tagen nach striatalem ischämischem Infarkt. An Tag 4, 5 und 7 nach Reperfusion war der T2-Wert in der ipsilateralen SN signifikant höher im Vergleich zur kontralateralen SN, n=5-9 Tiere, Werte in mean ± SEM, **p<0.001, *p<0.05.

4.3 Histologische Charakterisierung

Jeweils eine Gruppe männlicher SV-Mäuse (n=10) wurde nach 30-minütiger MCAo reperfundiert und am Tag 4, 7, 14 und 28 postoperativ getötet sowie daraufhin histologisch mit Markern für NeuN, TH und Iba1 gefärbt. Dabei interessierten die verschiedenen Zellpopulationen in der ipsilateralen SN im Vergleich zur kontralateralen Seite.

Färbung neuronaler Nuclei (NeuN)

Die NeuN-Färbung färbt neuronale Nuclei und ist daher geeignet, die Population aller lebender neuronaler Zellen darzustellen. Hierbei interessierte, ob nach striatalem Infarkt eine Verminderung der neuronalen Zellpopulation in der ipsilateralen SN auftritt. Sieben Tage nach MCAo erreichte die Dichte der NeuN-positiven Zellen in der ipsilateralen SN $53\pm 3\%$ der kontralateralen Zelldichte und damit eine signifikante Reduktion ($p < 0,001$). Nachfolgend blieb die ipsilaterale Zelldichte bei $63\pm 5\%$ an Tag 14 sowie $69\pm 4\%$ an Tag 28 signifikant reduziert (s. Abb. 4.5 und Abb. 4.6).

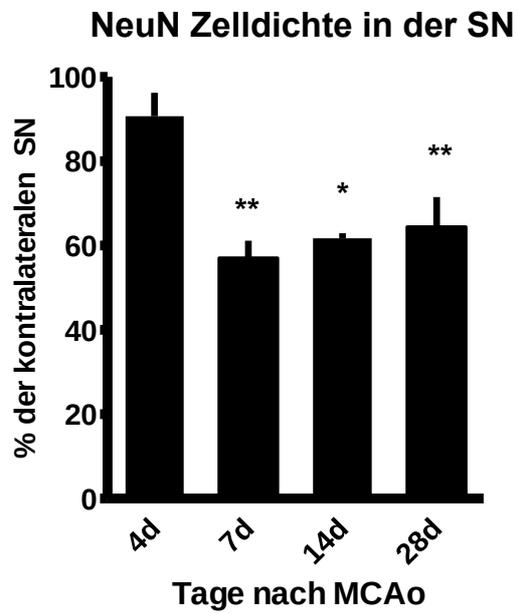


Abb. 4.5: Die Dichte der NeuN-positiven Zellen war in der ipsilateralen SN im Vergleich zur kontralateralen Seite ab Tag 7 postoperativ signifikant vermindert. n=3-6 Tiere pro Gruppe, Werte in mean \pm SEM, **p<0.001, *p<0.05.

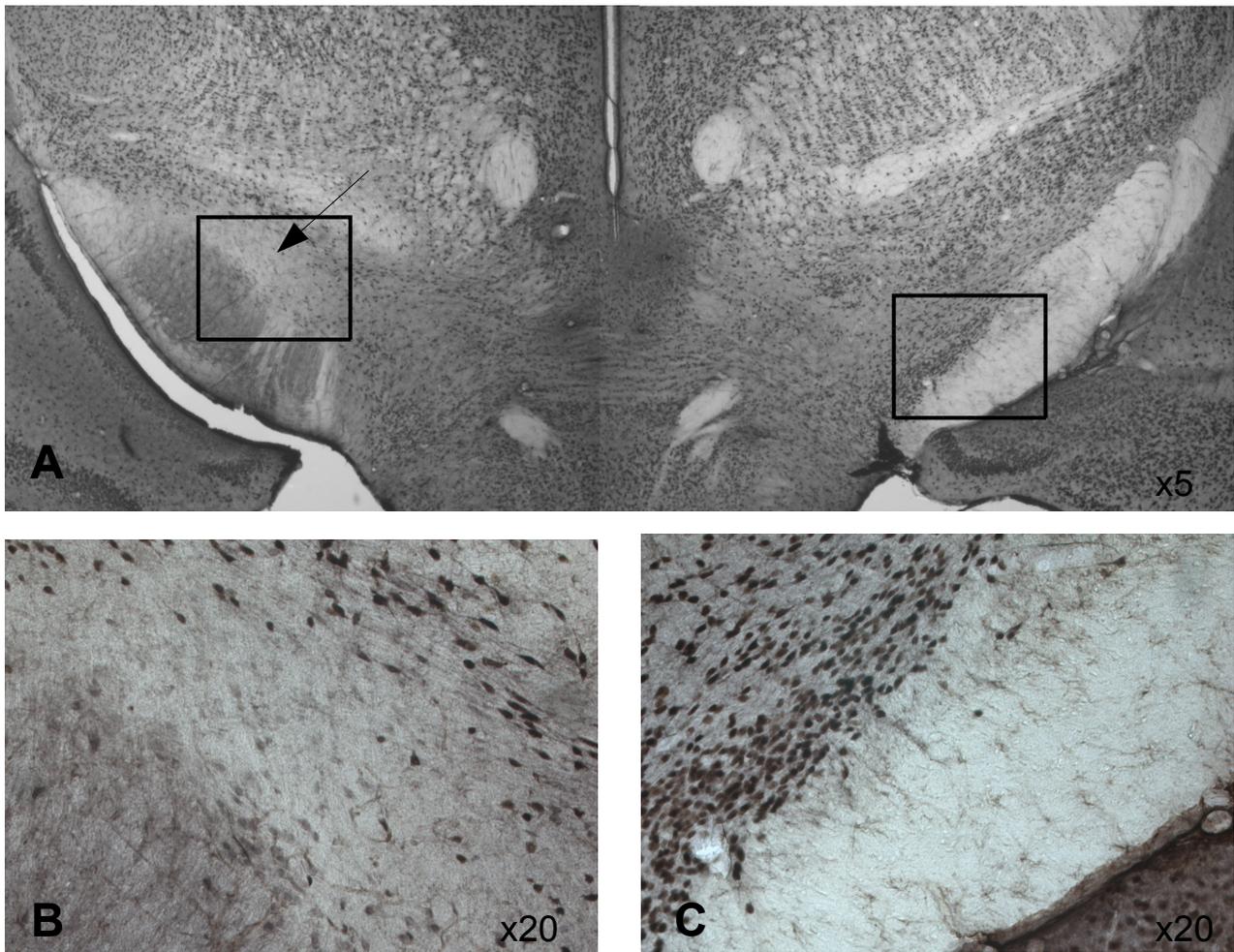


Abb. 4.6: Repräsentativer Mittelhirnschnitt in NeuN-Färbung. 14 Tage nach Reperfusion ist die neuronale Zelldichte in der ipsilateralen SN (Pfeil) im Vergleich zur kontralateralen Seite vermindert. Dieser Unterschied ist bei 5-facher Vergrößerung sichtbar (A). Bei 20-facher Vergrößerung ist die Verminderung der NeuN-positiven Zellzahl ipsilateral (B) im Vergleich zu kontralateral (C) deutlich erkennbar.

Färbung der Tyrosin Hydroxylase (TH)

Die TH-Färbung färbt ein Enzym, welches in der Synthese des Neurotransmitters Dopamin von spezifischer Bedeutung ist. In zerebralen Schnitten sind dopaminerge Neurone daher TH-positiv. Hierbei interessierte, ob nach striatalem Infarkt eine Reduktion der dopaminergen Neuronenpopulation in der ipsilateralen SN auftritt. Eine signifikante Reduktion der dopaminergen Zelldichte konnte an Tag 7 gezeigt werden. Hierbei war die ipsilaterale Zelldichte auf $59\pm 6\%$ der kontralateralen Seite vermindert ($p < 0,001$). Anschließend erreichte die Reduktion mit $43\pm 4\%$ an Tag 14 und $50\pm 3\%$ an Tag 28 ebenfalls signifikante Werte (s. Abb. 4.7 und Abb. 4.8).

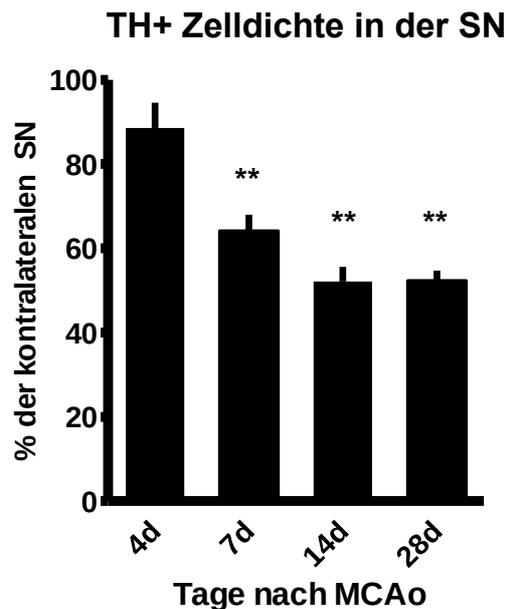


Abb 4.7: Die Dichte der TH-positiven Zellen war in der ipsilateralen SN im Vergleich zur kontralateralen Seite ab Tag 7 postoperativ signifikant vermindert. Der signifikante Unterschied war auch an Tag 14 und Tag 28 nach Reperfusion zu beobachten. $n=3-6$ Tiere pro Gruppe, Werte in $\text{mean} \pm \text{SEM}$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

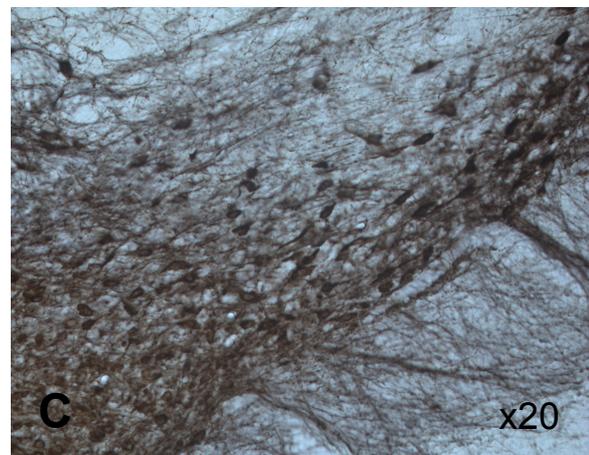
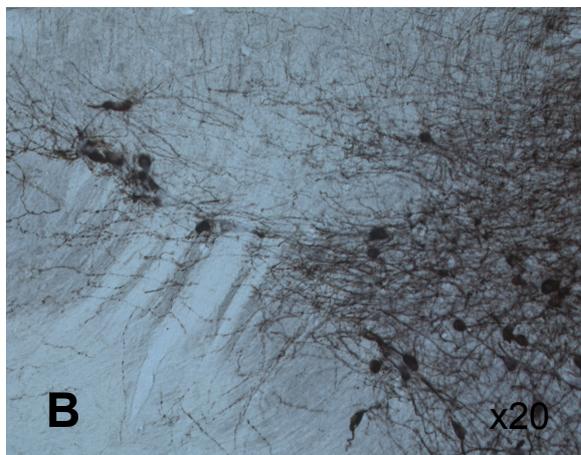
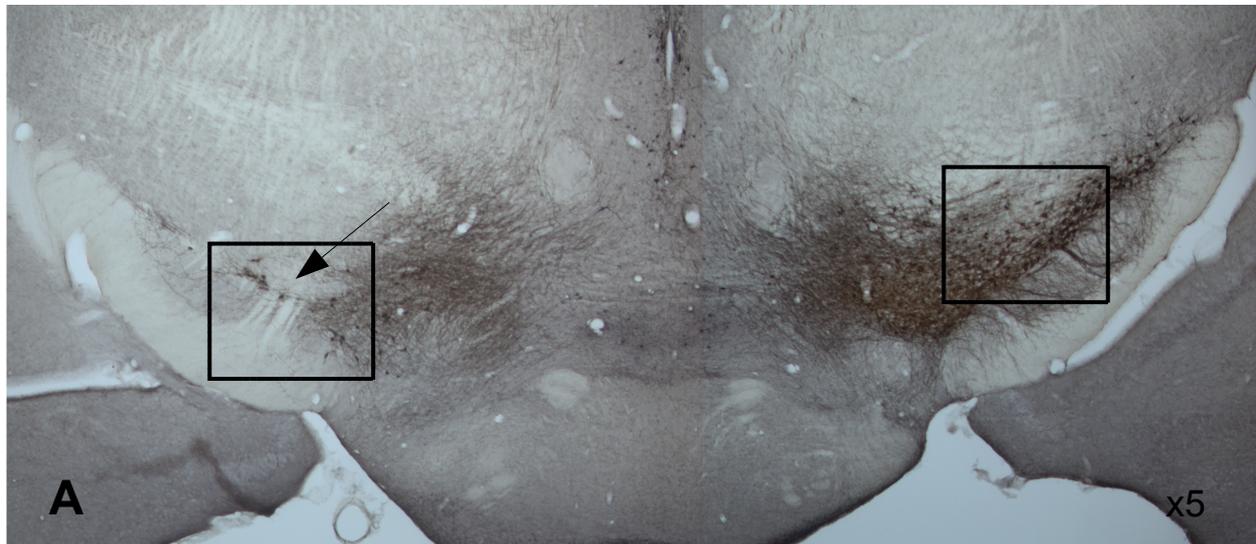


Abb. 4.8: Repräsentativer Mittelhirnschnitt in TH-Färbung. 14 Tage nach Reperfusion ist die TH-positive Zelldichte in der ipsilateralen SN (Pfeil) im Vergleich zur kontralateralen Seite vermindert. Dieser Unterschied ist bei 5-facher Vergrößerung sichtbar (A). Bei 20-facher Vergrößerung ist eine verminderte Zell- und Zellfortsatzdichte ipsilateral (B) im Vergleich zur kontralateralen Seite (C) sichtbar.

Färbung des Ionized-Calcium-Binding-Adapter-Molecule-1 (Iba1)

Die Iba1-Färbung färbt das zytoplasmatische Protein Ionized-Calcium-Binding-Adapter-Molecule-1, welches in Makrophagen und Mikroglia exprimiert ist. Es interessierte, ob nach striatalem Infarkt ein Anstieg an Mikroglia in der ipsilateralen SN auftritt. An Tag 4 und Tag 7 konnte ipsilateral eine erhöhte Iba1-positive Zelldichte gezeigt werden, die $170\pm 22\%$ bzw. $207\pm 18\%$ der kontralateralen Seite betrug. Anschließend fiel die Iba1-positive Zelldichte bis Tag 14 auf $150\pm 10\%$ ab. Noch an Tag 28 lag sie bei $149\pm 19\%$ (s. Abb. 4.9 und Abb. 4.10).

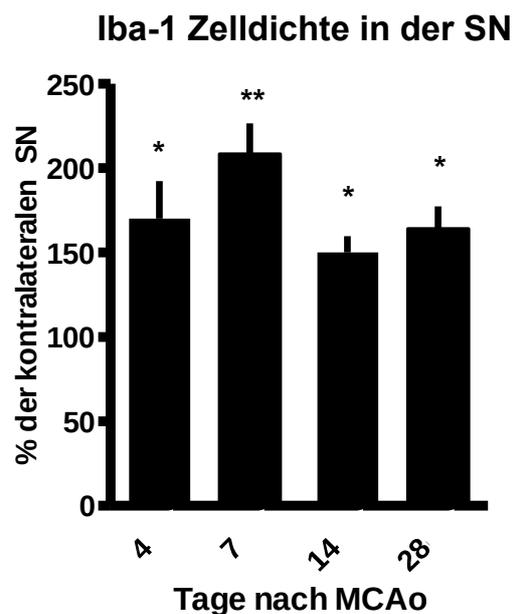


Abb. 4.9: Die Dichte der Iba1-positiven Zellen war in der ipsilateralen SN im Vergleich zur kontralateralen Seite ab Tag 4 postoperativ signifikant erhöht. Im Verlauf von 28 Tagen kam es zu keiner Normalisierung. n=3-6 Tiere pro Gruppe, Werte in mean \pm SEM, **p<0.001, *p<0.05.

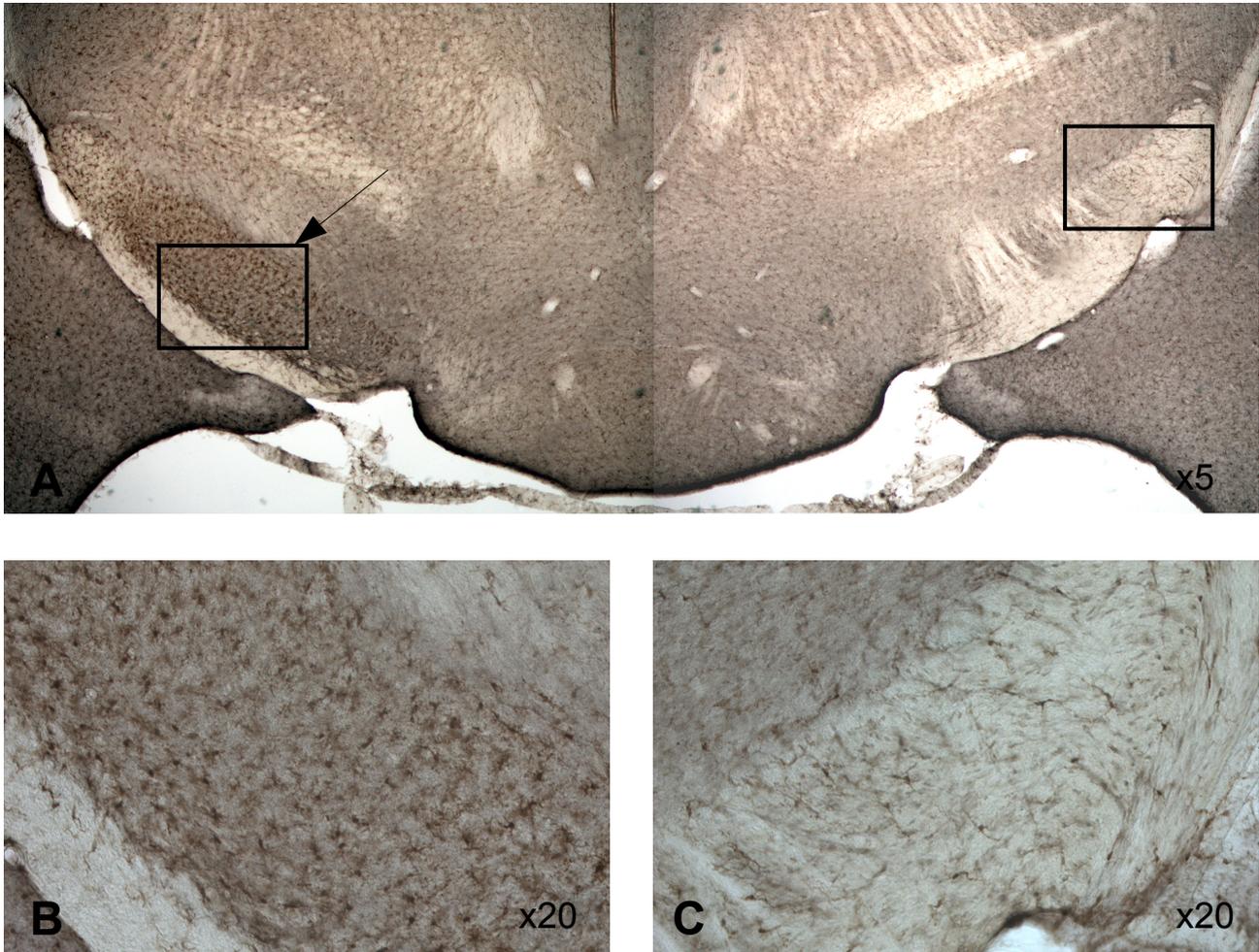


Abb. 4.10: Repräsentativer Mittelhirnschnitt in Iba1-Färbung. 14 Tage nach Reperfusion ist die Dichte Iba1-positiver Zellen in der ipsilateralen SN (Pfeil) im Vergleich zur kontralateralen Seite deutlich erhöht. Diese Veränderung ist bei 5-facher Vergrößerung sichtbar (A). Bei 20-facher Vergrößerung ist qualitativ eine deutliche Zunahme und Aktivierung Iba1-positiver Zellen ipsilateral (B) im Vergleich zu kontralateral (C) erkennbar.

4.4 Therapeutische Intervention

Für die Untersuchungen mit MK-801 und FK506 wurden jeweils zwei Gruppen (n=10) männlicher SV-Mäuse verwendet. An Tag 0 wurden alle Tiere der 30-minütigen MCAo mit anschließender Reperfusion unterzogen. Am ersten Tag postischämisch erfolgte eine T2-MRT-Messung, um den striatalen Schlaganfall nachzuweisen und dessen Volumen zu berechnen. An Tag 5 begann die Applikation von MK-801 oder FK506 i.p. in jeweils einer Gruppe von Tieren. Die entsprechenden Kontrollgruppen erhielten das Vehikel intraperitoneal. Die Injektionen wurden bis Tag 28 in 24-stündigem Abstand durchgeführt. An Tag 28 wurden die Hirne aller Gruppen für die histologische Auswertung entnommen (s.Abb. 4.11).

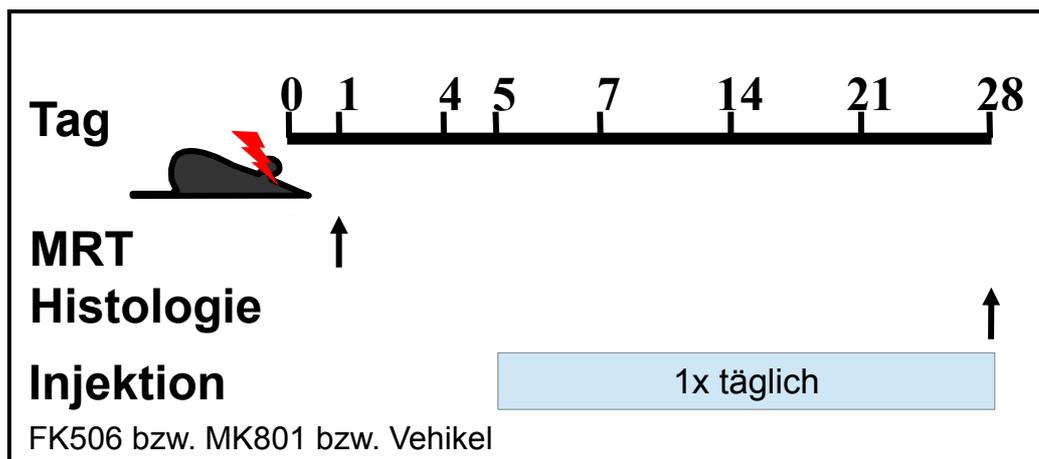


Abb. 4.11: Protokoll für die Behandlung mit jeweils FK501 und MK-801. Die MCAo erfolgte an Tag 0; ab Tag 5 erfolgte die Applikation mit FK501 oder Vehikel bzw. MK-801 oder Vehikel; die Organgewinnung an Tag 28.

FK506 (Tacrolimus)

FK506 ist ein Inflammationshemmer vom Typ der Calcineurin-Inhibitoren. Eine Gruppe operierter Tiere (n=10) erhielt von Tag 5 bis Tag 28 nach MCAo täglich 1 mg/kg KG FK506 in einer Lösung mit 0,9% NaCl i.p. Die Kontrollgruppe erhielt von Tag 5 bis Tag 28 nach MCAo die Trägersubstanz (NaCl 0,9%). Bei allen operierten Tieren wurde an Tag 1 postoperativ ein striataler Infarkt in der T2-gewichteten MRT-Messung nachgewiesen. Nach 28 Tagen wurden die Tiere getötet und die Hirne für NeuN-, TH- und Iba1-Färbungen weiter prozessiert. Es interessierte insbesondere, ob FK506 eine Reduktion der Iba1-positiven Zellpopulation in der ipsilateralen SN herbeiführt. Außerdem interessierte, ob es einen neuroprotektiven Effekt auf NeuN- und TH-positive Zellen in der ipsilateralen SN hat. Um zu untersuchen, ob FK506 bei dem späten Beginn der Applikation einen neuroprotektiven Effekt auf das infarzierte Striatum hat, wurde auch die NeuN-positive Zellpopulation im Striatum quantifiziert.

Die Iba1-positive Zelldichte (s. Abb. 4.12C) war in beiden Gruppen ipsilateral erhöht. Dabei lag sie in der FK506-Gruppe bei $154 \pm 7\%$ der kontralateralen Zelldichte, in der Vehikel-Gruppe bei $140 \pm 7\%$. Ein signifikanter Unterschied zwischen der FK506-Gruppe sowie der Vehikel-Gruppe lag jedoch nicht vor ($p = 0,45$). Auch auf die TH-positiven sowie die NeuN-positiven Zellen in der ipsilateralen SN zeigte FK506 keinen signifikanten Effekt (s. Abb. 4.12A, B): Die TH-Zelldichte betrug in der FK506-Gruppe $67 \pm 5\%$ der kontralateralen Seite, in der Vehikelgruppe $62 \pm 4\%$ ($p = 0,51$).

Die NeuN-Zelldichte betrug in der FK506-Gruppe $62 \pm 6\%$ der kontralateralen SN, in der Vehikelgruppe $67 \pm 6\%$ ($p = 0,62$). Im Striatum (s. Abb. 4.12D) zeigte sich zwischen der FK506-Gruppe ($26 \pm 5\%$ der kontralateralen Seite) und der Vehikelgruppe ($24 \pm 2\%$ der kontralateralen Seite) kein signifikanter Unterschied ($p = 0,76$).

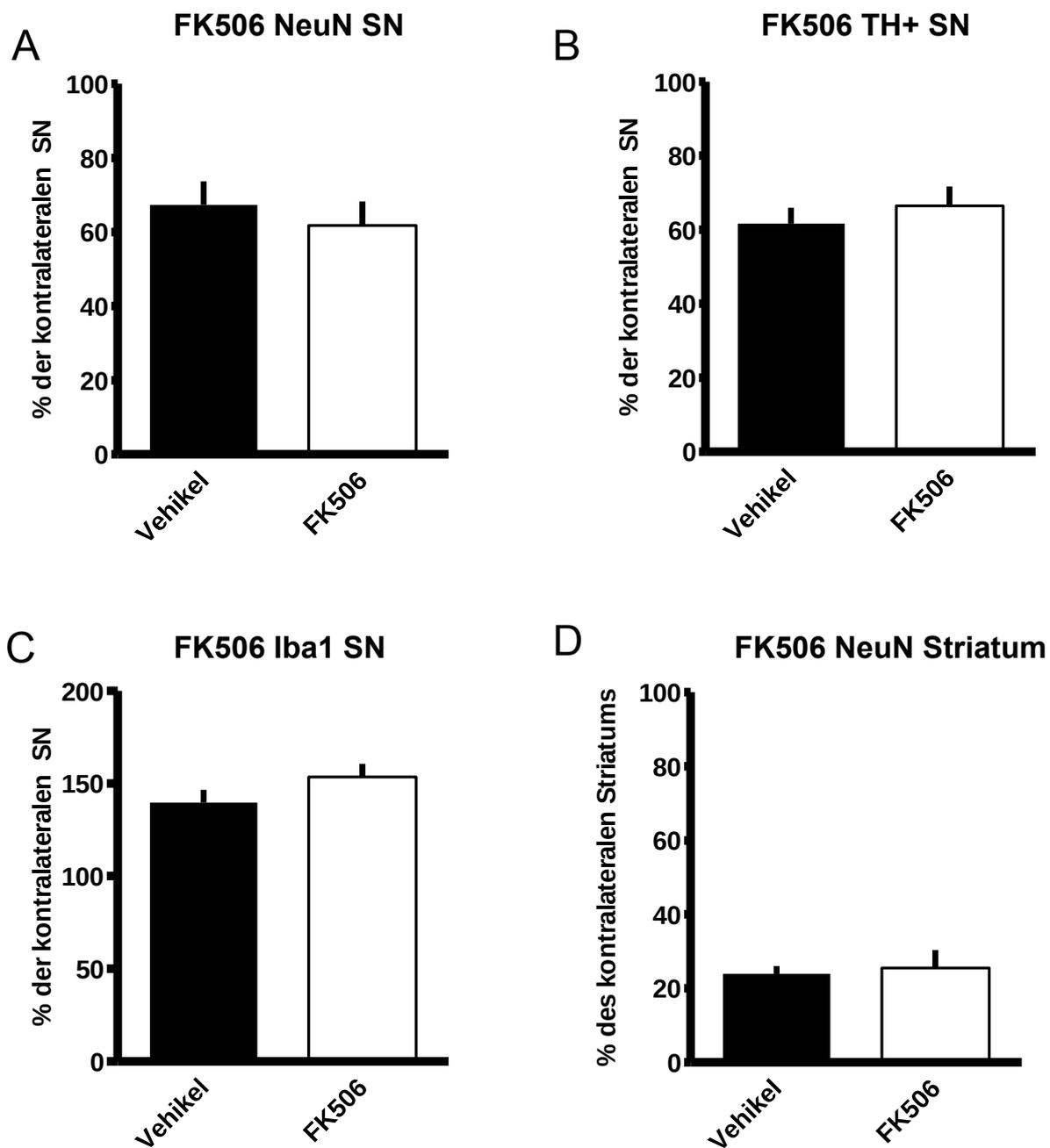


Abb 4.12: Die Behandlung mit FK506 bzw. Vehikel erfolgte von Tag 5 bis Tag 28 nach 30-minütiger MCAo. An Tag 28 bestand in der ipsilateralen SN kein signifikanter Unterschied der TH-positiven Zelldichte (A) und der NeuN-positiven Zelldichte (B). Die Iba1-positiv Zelldichte in der ipsilateralen SN zeigte keinen signifikanten Unterschied (C). Das ipsilaterale Striatum wies keinen signifikanten Unterschied der NeuN-positiven Zelldichte auf (D). Alle ipsilateralen Zelldichten sind angegeben als % der jeweils kontralateralen Seite. n=6-7 Tiere pro Gruppe, Werte in mean \pm SEM, **p<0.005, *p<0.05.

MK-801 (Dizocilpin)

MK-801 ist ein NMDA-Rezeptor-Antagonist. Eine Gruppe operierter Tiere (n=10) erhielt von Tag 5 bis Tag 28 nach MCAo täglich 1 mg/kg KG MK-801 in einer Lösung mit 0,9% NaCl i.p. Die Kontrollgruppe erhielt von Tag 5 bis Tag 28 nach MCAo die Trägersubstanz. Bei allen operierten Tieren konnte an Tag 1 postoperativ ein striataler Infarkt in der T2-gewichteten MRT-Messung nachgewiesen werden. Nach 28 Tagen wurden die Tiere getötet und die Hirne für NeuN-, TH- und Iba1-Färbungen weiter prozessiert. Es interessierte insbesondere, ob MK-801 einen neuroprotektiven Effekt auf NeuN- und TH-positive Zellen in der ipsilateralen SN hat. Dies würde darauf hinweisen, dass ein exzitotoxischer Mechanismus eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der EPND spielt. Um zu untersuchen, ob MK-801 bei unserem Applikationszeitpunkt einen neuroprotektiven Effekt auf das infarzierte Striatum hat, wurde auch die NeuN-positive Zellpopulation im Striatum quantifiziert. Da es Hinweise auf einen anti-inflammatorischen Effekt von MK-801 gibt, war zudem von Interesse, ob MK-801 zur Reduktion der Iba1-positiven Zellpopulation in der ipsilateralen SN führt.

Die Dichte TH-positiver Zellen war in beiden Gruppen in der ipsilateralen SN im Vergleich zur kontralateralen Seite vermindert. Dabei bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der MK-801-Gruppe ($86 \pm 6\%$) und der Vehikel-Gruppe ($57 \pm 3\%$) mit einem p-Wert von 0,0041 (s. Abb. 4.13B). In der MK-801-Gruppe wies auch die NeuN-positive Zellpopulation in der ipsilateralen SN eine signifikant höhere Dichte ($106 \pm 17\%$) im Vergleich zur Vehikel-Gruppe ($74 \pm 6\%$) auf mit einem p-Wert von: 0,01 (s. Abb. 4.13A). Die NeuN-Zelldichte wies im infarzierten Striatum (s. Abb. 4.13D) hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen der MK-801-Gruppe ($33 \pm 4\%$) und der Vehikel-Gruppe ($36 \pm 7\%$) auf (p-Wert= 0,74). Auch die Iba1-positive Zellpopulation in der ipsilateralen SN der MK-801-Gruppe ($115 \pm 10\%$) unterschied sich nicht signifikant von der Vehikel-Gruppe ($116 \pm 6\%$) mit einem p-Wert von 0,96 (s. Abb. 4.13C). In beiden Gruppen war die Iba1-positive Zelldichte jedoch ipsilateral im Vergleich zur kontralateralen Seite erhöht.

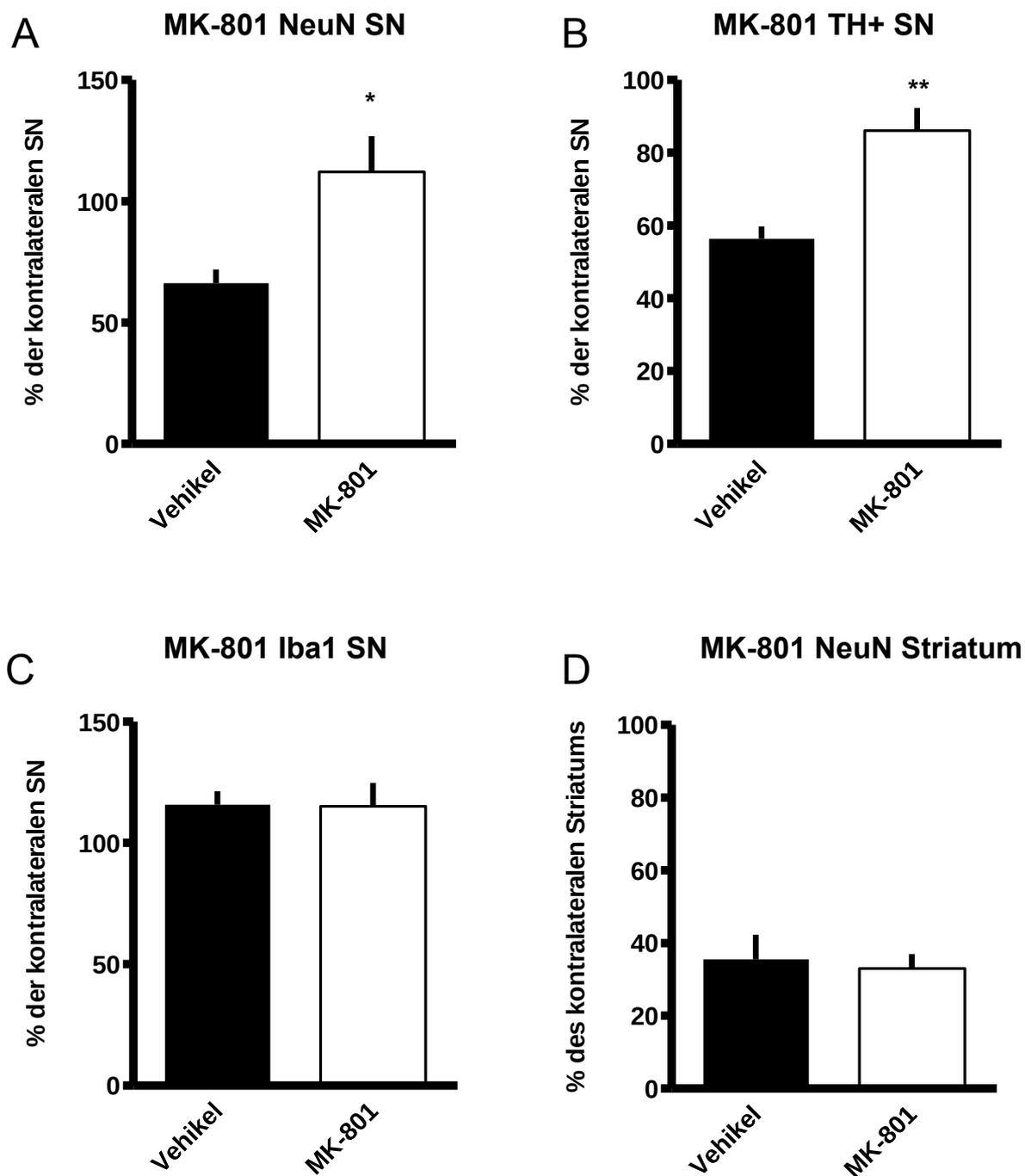


Abb. 4.13: Die Behandlung mit MK-801 bzw. Vehikel erfolgte von Tag 5 bis Tag 28 nach 30-minütiger MCAo. An Tag 28 bestand in der ipsilateralen SN ein signifikanter Unterschied der TH-positiven Zelldichte (A) sowie der NeuN-positiven Zelldichte (B). Das ipsilaterale Striatum wies keinen signifikanten Unterschied der NeuN-positiven Zelldichte auf (C). Die Iba1-positive Zelldichte in der ipsilateralen SN zeigte keinen signifikanten Unterschied (D). Alle ipsilateralen Zelldichten sind angegeben als % der jeweils kontralateralen Seite. n=5-7 Tiere pro Gruppe, Werte in mean \pm SEM, **p<0.005, *p<0.05.

5 Diskussion

5.1 Interpretation der Befunde

Diese Arbeit führte zu folgenden Ergebnissen: (1) innerhalb einer Woche nach striatalem Infarkt kommt es in der ipsilateralen SN zu einer neuronalen Degeneration, die sich histopathologisch durch einen signifikanten Verlust neuronaler und insbesondere dopaminerger Neurone manifestiert. (2) Die MRT-Messungen zeigten im Bereich der SN signifikante Veränderungen, die auf ein zelluläres Ödem hinweisend sind. Diese wurden zeitlich bereits vor einer signifikanten neuronalen Degeneration sichtbar, sodass durch MRT-Bildgebung eine EPND in der SN antizipiert werden kann. (3) Die anti-exzitotoxische Substanz MK-801 zeigte im Gegensatz zur anti-inflammatorischen Substanz FK506 einen neuroprotektiven Effekt auf die SN bei einem Applikationsbeginn von 5 Tagen nach dem primären striatalen Infarkt.

Die EPND ist ein Phänomen nach ischämischem Schlaganfall, welches auch beim Menschen bereits beobachtet werden konnte. Es gibt Hinweise, dass es an postischämischen funktionellen Einschränkungen beteiligt sein könnte. Dennoch ist die EPND beim Menschen nicht verstanden und bisher auch im Tiermodell nicht ausreichend untersucht worden. So fehlt bisher eine systematische Charakterisierung im Mausmodell, welche im Rattenmodell bereits begonnen worden ist. Das Mausmodell eignet sich jedoch besser für funktionelle Testungen sowie für den Einsatz transgener Tiere. Zudem stehen die Untersuchungen zu den Mechanismen der EPND noch weit am Anfang.

Magnetresonanztomographische Charakterisierung

Bereits in den 80er Jahren wurde von neuronalem Zellverlust in menschlichem post mortem Hirngewebe in der SN nach Infarzierung der Basalganglien berichtet (Forno 1983). In MRT-Studien

zeigte sich nach striatalem Infarkt in der T2-Wichtung eine Hyperintensität in der ipsilateralen SN, sowie ein reduzierter ADC-Wert in der DWI-Wichtung. Diese Erscheinung trat frühestens 8 Tage nach dem Infarktereignis auf und persistierte bis zu fünf Monate (Nakane et al. 1992; Nakajima et al. 2010). Es gibt Hinweise, dass eine postischämische T2-Hyperintensität in der SN immer auf einen striatalen Infarkt zurückgeht (Ohe et al. 2013). In der bisher größten klinischen Studie konnte ein Zusammenhang zwischen einer ischämischen Läsion im Striatum mit einer postischämischen Reduktion des ADC-Werts in der SN gezeigt werden (Nakajima et al. 2013).

Im Tiermodell wurde ein neuronaler Zellverlust in der ipsilateralen SN ein bis zwei Wochen nach einem Infarkt im MCA-Gebiet erstmals bei Ratten beschrieben (Tamura et al. 1990; Nagasawa and Kogure 1990; Nakanishi et al. 1997).

Erste magnetresonanztomographische Charakterisierungen des Phänomens im Rattenmodell zeigten eine erhöhte T2-Signalintensität vier Tage nach einem ipsilateralen kortiko-striatalen Infarkt (Nakane et al. 1997), sowie eine Reduktion des ADC-Werts (Nakane et al. 2001).

In dynamischen Charakterisierungen im Rattenmodell waren die Veränderungen im MRT nur an Tag 4 sichtbar, nicht jedoch zu späteren Zeitpunkten. Histologisch zeigten sich an Tag 4 blass gefärbte Neurone, sowie vergrößerte perivaskuläre Räume. Es handelt sich also hierbei um eine Zellschwellung. An Tag 7 waren dunkel gefärbte Neurone prominenter und es wurde ein Zellverlust sichtbar (Zhao et al. 2001; Zhao et al. 2002). Diese Studien geben somit Hinweise, dass die bildgebenden Veränderungen vor einem Zellverlust stattfinden und diesen vorhersagen könnten.

In unseren MRT-Studien konnte gezeigt werden, dass in der T2-Messung der T2-Wert in der ipsilateralen SN an Tag 4, 5 und 7 nach striatalem Infarkt signifikant erhöht war. In der DWI-Messung zeigte sich ebenda ein signifikant erniedrigter ADC-Wert ebenfalls an Tag 4, 5 und 7. Zu den weiteren gemessenen Zeitpunkten an Tag 14, 21 und 28 zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Nach 3 und 4 Wochen kam es zu einer Normalisierung der Ausgangswerte.

Diese Daten weisen darauf hin, dass im Bereich der ipsilateralen SN nach striatalem Infarkt ein pathologisches Geschehen stattfindet. Dieses findet sich außerhalb der primären striatalen Läsion,

ist also exofokal (engl. exofocal), und tritt mit einer zeitlichen Latenz auf, ist also verschoben (engl. delayed).

In einem T2-gewichteten Bild erscheint Wasser heller als das umliegende Gewebe. Daher deutet ein erhöhter T2-Wert auf eine Wassereinlagerung hin. Eine solche tritt zum Beispiel bei Ödemen auf.

Die DWI-Messung dient zur Darstellung und Quantifizierung einer erhöhten Diffusion von Wassermolekülen im Gewebe. Da im biologischen Organismus keine idealen Verhältnisse vorliegen, wird nicht der Diffusions-Koeffizient ermittelt, sondern der sog. scheinbare Diffusionskoeffizient oder ADC. Ein erhöhter ADC-Wert weist auf ein vasogenes Ödem hin, während ein erniedrigter ADC-Wert auf ein zytotoxisches Ödem hindeutet.

Die MRT-Daten unserer Studie weisen somit darauf hin, dass es sich bei dem Geschehen in der ipsilateralen SN um einen zellschädigenden Prozess handelt, der mit einem zytotoxischen Ödem einhergeht und in räumlicher und zeitlicher Latenz zu der primären ischämischen Läsion auftritt.

Mittels dieser MRT-Sequenzen ist nicht sichtbar, um welche spezifische Pathologie es sich handelt. Es ist somit auch nicht sichtbar, welche Zellpopulationen betroffen sind. Weiterführende histologische Untersuchungen waren daher notwendig, um die beteiligten Zellpopulationen zu identifizieren, zu quantifizieren und ins zeitliche Verhältnis zu den MRT-Daten zu setzen.

Histologische Charakterisierung

Im Zuge einer striatalen Ischämie kommt es zu einem relevanten neuronalen Zellverlust im Striatum, sodass dort mit einer verminderten Dopaminaufnahme zu rechnen ist. Kronenberg et al. konnten zeigen, dass die Dichte von Dopamintransportern (DAT) im Striatum nach MCAo und auch die striatale Dopaminkonzentration signifikant vermindert ist (Kronenberg et al. 2012). Zudem zeigten sie, dass es ab Tag 7 nach MCAo auch in der ipsilateralen SN zu einer signifikanten Degeneration neuronaler Zellen kommt, und dass es sich hierbei insbesondere um dopaminerge Neurone handelt. Unsere Ergebnisse stehen damit in Einklang.

Die verminderte striatale Dopaminkonzentration nach MCAo kann somit einerseits durch eine verminderte DAT-Dichte und damit Dopaminaufnahme im Striatum erklärt werden, andererseits durch eine verminderte Dopaminausschüttung aus der SN.

Die Degeneration dopaminergere Zellen in der SN trat in unseren Untersuchungen an Tag 7 später auf als die Veränderungen im MRT, welche bereits an Tag 4 und Tag 5 nach MCAo sichtbar wurden. Damit kann das MRT eingesetzt werden, um einen neuronalen Zelluntergang in der SN zu antizipieren.

Unsere Untersuchungen zum weiteren Verlauf neuronaler Zellen in der ipsilateralen SN zeigten, dass die Zelldichte sowohl NeuN-positiver als auch TH-positiver Zellen bis Tag 28 vermindert war. Soriano et al. argumentierten mit ihren Ergebnissen im Rattenmodell, dass die Reduktion TH-positiver Zellen in der ipsilateralen SN transient ist und es bis Tag 30 zu einer teilweisen, bis Tag 60 sogar zu einer vollständigen Erholung kommt (Soriano et al. 1997). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Yamada et al., die bereits 30 Tage nach Infarkt keinen signifikanten Unterschied zwischen ipsilateraler und kontralateraler SN messen konnten (Yamada et al. 1996).

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen hingegen, dass es auch im Mausmodell zu einer Reduktion dopaminergere Neurone und anderer neuronaler Zellen in der ipsilateralen SN kommt, die mindestens 28 Tage persistiert. Wir können nicht ausschließen, dass sich diese Veränderung auch in unserem Modell im weiteren Verlauf normalisiert. Kronenberg et al. zeigten jedoch, dass die Reduktion nigraler Neurone auch 16 Wochen nach MCAo noch zu beobachten ist (Kronenberg et al. 2012).

Die Mechanismen, die zur EPND führen, sind bisher ungeklärt. Es wird angenommen, dass eine transneuronale Degeneration eine entscheidende Rolle spielt (Zhao et al. 2002). Es ist bekannt, dass diese nach neuronalen Läsionen unterschiedlicher Genese auftreten kann.

1850 hat August Waller das Phänomen der neuronalen Degeneration nach axonaler Schädigung im Froschexperiment beschrieben (Waller 1850). Die nach ihm benannte Wallersche Degeneration

bezeichnet seither die axonale Degeneration distal der primären Läsion. Sie ist eine sogenannte anterograde Degeneration, da sie der Projektionsrichtung des Neurons folgt. Davon unterschieden wird die retrograde Degeneration, zu der es nach einer Schädigung der efferenten Neurone kommt. Sie erfolgt also entgegen der Projektionsrichtung (Cowan 1970).

Da zwischen Striatum und SN eine reziproke neuronale Verbindung besteht, kommen sowohl die anterograde als auch die retrograde Degeneration in Betracht. Es ist bereits bekannt, dass diese Formen der Degeneration nach einer toxischen Schädigung des Striatums in der ipsilateralen SN auftreten (Krammer 1980; Pasinetti, Morgan und Finch 1991; Lundberg, Victorin und Björklund 1994).

Auch die Mechanismen, die daraufhin in der exofokalen Region selbst stattfinden, sind nur teilweise beschrieben und verstanden: oxidative Schädigungen und apoptotische Veränderungen sind als Mechanismen der EPND im Thalamus nachgewiesen worden (Zhang et al. 2012). In der SN ist die Rolle der Apoptose umstritten (Stefanis und Burke 1996; DeGiorgio et al. 1998), am ehesten sind hier exzitatorische und inflammatorische Geschehen involviert (Block, Dihné und Loos 2005). In den hier vorgenommenen Untersuchungen lag der Fokus der Untersuchungen auf Exzitotoxizität und Inflammation. Aus Studien zur primären Ischämie ist bekannt, dass diese Mechanismen maßgeblich an protektiven sowie schädigenden Prozessen beteiligt sind (s. Abb. 5.1).



Abb. 5.1: Vereinfachte Darstellung des zeitlichen Verlaufs der wichtigsten schädigenden sowie protektiven pathophysiologischen Mechanismen nach zerebraler Ischämie im primären Ischämiegebiet (Endres et al. 2008).

Inflammatorische Reaktionen treten häufig als Folge einer initialen Zellschädigung auf und sind im Verlauf an weiteren neurodegenerativen als auch neuroprotektiven Prozessen beteiligt. Inflammatorische Zellen migrieren zum Läsionsort, werden aktiviert und proliferieren. Die Mechanismen können am Abbau untergegangener Neurone beteiligt sein, zu weiterer Zellschädigung führen oder beispielsweise auch eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke bewirken. Dies kann eine Migration von peripheren inflammatorischen Zellen ins ZNS zur Folge haben. Allerdings gibt es neuere Hinweise von Enzmann et al., dass es in der frühen postischämischen Phase zu keiner Migration inflammatorischer Zellen ins Hirnparenchym kommt (Enzmann et al. 2013).

In der vorliegenden histologischen Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass Iba1-positive Zellen in der ipsilateralen SN an Tag 4 und 7 nach MCAo im Vergleich zur kontralateralen Seite vermehrt auftreten. Dies geschieht also bereits vor einer signifikanten Neurodegeneration. Es ist hier nicht klar, ob sie zu der neuronalen Degeneration beitragen, oder ob die neuronale Degeneration ohne sie stärker ausfallen würde. Aus Studien zur primären Schlaganfallläsion ist

bekannt, dass Iba1-positive Mikroglia am Abbau von Zelldebris beteiligt ist sowie an der Ausschüttung zytoprotektiver Substanzen, jedoch auch an einer entzündlichen Zellschädigung (Wang, Tang und Yenari 2007; Napoli und Neumann 2009). Einige Autoren betonen jedoch die neuroprotektiven Eigenschaften (Napoli und Neumann 2009; Minagar 2011).

Gelderblom et al. konnten zeigen, dass Makrophagen und Mikroglia in der primären ischämischen Läsion an Tag 1 und 3 nach einstündigem Infarkt im Mausmodell signifikant ansteigen. An Tag 7 kam es dabei bereits zu einer Reduktion (Gelderblom et al. 2009). Auch die Untersuchungen von Färber et al. zeigten einen Anstieg Iba1-positiver Zellen von Tag 1 bis Tag 4 nach 1h MCAo in der Maus (Färber et al. 2008).

In Studien zur EPND in der SN gibt es bisher nur den Hinweis, dass Iba1-positive Zellen an Tag 3 und 7 in der ipsilateralen SN im Rattenmodell erhöht sind, ohne den weiteren Verlauf zu untersuchen (Dihné und Block 2001; Loos, Dihné und Block 2003). Unsere Ergebnisse im Mausmodell zeigen den Verlauf der Iba1-positiven Zelldichte über eine Zeit von 28 Tagen nach MCAo. Nach dem Anstieg bis Tag 7 kommt es anschließend zu einem sukzessiven Abfall der Iba1-positiven Zelldichte, die sich im Verlauf bis Tag 28 nicht normalisiert.

Anhand der Ergebnisse ist allerdings nicht unterscheidbar, ob es sich um proliferierte oder migrierte Standortmikroglia handelt, oder um Makrophagen, die aus dem peripheren Blut über eine permeable Bluthirnschranke eingewandert sind. Zu einer Differenzierung sind weitere Experimente notwendig, die im Ausblick näher vorgestellt werden.

Neben Mikroglia wird zunehmend auch Astrozyten in der inflammatorischen Reaktion eine wichtige Rolle zugeschrieben, was als reaktive Astroglieose bezeichnet wird. Während sie im physiologischen Zustand den Erhalt der neuronalen Zellfunktion unterstützen, scheinen sie nach ischämischen Ereignissen an schädigenden Mechanismen beteiligt zu sein (Wang, Tang und Yenari 2007). Auch bei Astrozyten gibt es jedoch Hinweise, dass sie sowohl proinflammatorische als auch anti-inflammatorische Substanzen exprimieren (Minagar 2011). In einer Pilotstudie konnten wir qualitativ bestätigen, dass GFAP-positive Zellen an Tag 14 nach Infarkt vermehrt in der ipsilateralen SN auftreten. Obwohl GFAP kein spezifischer Marker für Astrozyten im Zentralen

Nervensystem ist, bietet dies einen Hinweis für eine astrozytäre Beteiligung am postischämischen Geschehen in der SN. Bisher ist bekannt, dass eine astrozytäre Reaktion in der ipsilateralen SN an Tag 7 nach striatalem Infarkt im Rattenmodell auftritt (Dihné und Block 2001; Loos, Dihné und Block 2003). Wir beobachteten, dass sie auch im Mausmodell von Bedeutung zu sein scheint. Um den Verlauf der astrozytären Reaktion zu beschreiben und um zu verstehen, ob sie neuroprotektiv oder neurodegenerativ ist, sind weitere Untersuchungen notwendig. Eine quantitative Auswertung ist hier jedoch nur eingeschränkt möglich.

Therapeutische Intervention

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der EPND näher zu verstehen und um potentielle Neuroprotektiva zu untersuchen, führten wir Experimente (1) mit dem etablierten Anti-Inflammativum Tacrolimus (FK506) sowie (2) mit dem anti-exzitotoxisch wirksamen Dizocilpin (MK-801) durch.

(1) FK506 zeigte tierexperimentell bisher nach akuter Gabe eine protektive Wirkung sowohl in der primären als auch in der sekundären Läsion nach MCAo: eine Metaanalyse zu Untersuchungen in Ratten und Mäusen zeigte, dass sich das volumetrische Outcome der primären striatalen Läsion vor allem bei Dosierungen über 0,03 mg/kg KG und einem Applikationszeitpunkt von 3 Tagen vor MCAo bis 5 Stunden nach MCAo verbesserte (Macleod et al. 2005). In den zitierten Mausstudien wurde das Therapeutikum jeweils intraperitoneal (i.p.) appliziert (Aronowski et al. 2000; McCarter et al. 2001; Shichinohe et al. 2004).

Im Rattenmodell konnten Brecht et al. zeigen, dass FK506 in einer Dosierung von 1 mg/kg KG s.c. und einer Therapiezeit von 1 Tag vor MCAo bis 10 Tage nach MCAo auch einen signifikanten Effekt auf die sekundäre Läsion in der ipsilateralen SN hat. Dabei konnte eine deutliche Reduktion von ED-1- und Iba1-positiven Mikroglia beobachtet werden, sowie einen leichten Rückgang von

GFAP-positiven Astrozyten. Zudem zeigte FK506 eine neuroprotektive Wirkung auf die TH-positiven Neurone der ipsilateralen SN (Brecht et al. 2009).

Im Mausmodell gibt es bisher keine Studie, die den Effekt von FK506 in der sekundären Läsion der SN beobachtet. Zudem gibt es keine Studie, die der Frage nachgeht, ob FK506 auch zu einem späteren Applikationszeitpunkt einen Effekt zeigt und die vorhandenen Studien gehen nicht über 20 Tage hinaus.

Um den Effekt eines späten Applikationszeitpunkts und einer länger dauernden Therapie mit FK506 im Mausmodell zu untersuchen, wählten wir eine tägliche Applikation von Tag 5 bis Tag 28, sowie eine Dosierung von 1 mg/kg KG i.p.

In unseren Ergebnissen zeigte FK506 jedoch bei dieser Dosierung und Applikationszeit keinen neuroprotektiven Effekt auf das Striatum noch auf die ipsilaterale SN. Zudem zeigte FK506 keinen Effekt auf die Mikroglia-dichte in der ipsilateralen SN. Bisher sind unsere Versuche nach bestem Wissen die ersten, die FK506 in einer Dosierung von 1 mg/kg KG von Tag 5 bis Tag 28 nach MCAo applizieren. Somit ist nicht ausgeschlossen, dass FK506 in höherer Dosierung oder zu einem früheren subakuten Zeitpunkt einen Effekt zeigen könnte. Weitere Untersuchungen können sich hier daher anschließen.

(2) MK-801 hingegen zeigte in unseren Studien bei subakuter Applikation und einer Dosierung von 1 mg/kg KG i.p. täglich von Tag 5 bis Tag 28 einen deutlichen neuroprotektiven Effekt insbesondere auf dopaminerge Neurone in der ipsilateralen SN.

Der anti-exzitotoxisch wirksame NMDA-Rezeptor Antagonist Dizocilpin (MK-801) zeigte bisher sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen einen neuroprotektiven Effekt in der primären ischämischen Läsion. Wirksam war eine intraperitoneale Applikation von 1 bis 5 mg/kg Körpergewicht vor MCAo und 3 mg/kg KG bis 1 Stunde nach MCAo, jedoch nicht darüber hinaus (Hatfield, Gill und Brazell 1992; Ma, Endres und Moskowitz 1998; Endres et al. 1998).

MK-801 zeigte einen protektiven Effekt auch auf neuronale Zellen der SN nach neurotoxischer Läsion des Striatums in Ratten. Bei intraperitonealer Applikation 24 Stunden nach der primären

Schädigung war der neuronale Zellverlust bei 1 oder 4 mg/kg KG vermindert, bei 10 mg/kg KG sogar aufgehoben (DeGiorgio, DeGiorgio und Volpe 1999; Block et al. 2004; Block, Dihné und Loos 2005). Hierbei konnte MK-801 auch die Anzahl TNF- α positiver Zellen vermindern, was auf einen Zusammenhang zwischen exzitotoxischen und inflammatorischen Mechanismen in der SN hinweist (Block et al. 2004). In unseren Studien konnten wir jedoch keinen Effekt von MK-801 auf die Mikroglia dichte in der SN zeigen.

Bisher gibt es nach unserem Wissen keine Studien, die einen initialen Applikationszeitpunkt nach 24 Stunden wählen. Zudem gibt es keine Studien, die MK-801 nach ischämischer striataler Läsion in Mäusen einsetzen, um den Effekt auf die NeuN-positive Zellpopulation in der SN zu untersuchen.

Gleichwohl wir hier einen Effekt auf die neuronale Population der ipsilateralen SN zeigen konnten, hatte MK-801 in unseren Studien keinen Effekt auf die striatalen Neurone nach MCAo. Damit scheint ausgeschlossen, dass ein protektiver Effekt im Bereich des primären Infarkts zu einer verminderten EPND in der SN geführt haben könnte. Die Ergebnisse unterstreichen zum einen die Beteiligung eines exzitotoxischen Mechanismus in der Pathophysiologie der EPND. Andererseits zeigen sie, dass ein NMDA-Rezeptor-Antagonist auch nach subakuter Applikation einen therapeutischen Effekt auf die EPND hat.

Hinsichtlich eines exzitatorischen Mechanismus in der SN nach striataler Schädigung waren die Studien von Saji et al. wegweisend. Die intraventrikuläre Gabe des GABA-Agonisten Muscimol konnte den neuronalen Zellverlust in der SN nach striataler Injektion von Ibotensäure verhindern (Saji und Reis 1987). Nach striato-pallidaler Ischämie zeigte sich in der ipsilateralen SN ein neuronaler Zellverlust und eine erhöhte Synthese von Glutamatdecarboxylase (Saji et al. 1994). Der Zellverlust konnte nach Ablation des Nucleus subthalamicus verhindert werden (Saji, Blau und Volpe 1996). Diese Funde sprechen für einen verminderten GABA-Input der SN nach striataler Läsion, sowie eine neuronale Schädigung durch Glutamat-Disinhibition. Daher ist der experimentelle Einsatz von GABA-Agonisten bzw. NMDA-Rezeptor Antagonisten wie MK-801 für weitere Untersuchungen von Interesse.

Gegenüber einer klinischen Anwendung von MK-801 gibt es jedoch begründete Vorbehalte, da

Olney et al. darauf hinweisen konnten, dass es bereits bei einmaliger Gabe und niedriger Dosierung zu neuropathologischen Veränderungen führen kann (Olney, Labruyere und Price 1989).

5.2 Kritische Betrachtungen

Die Übertragbarkeit von Ergebnissen in Tiermodellen auf klinische Fälle ist nur eingeschränkt möglich. Das liegt erstens an Spezies-Unterschieden, die nicht veränderbar sind. Zweitens wurden hier junge Tiere ohne weitere Pathologien und Komorbiditäten benutzt. Zudem kann das Filament-Model der MCAo einen thromboembolischen Verschluss nicht vollständig abbilden. Auf diese Probleme ist bereits ausführlich hingewiesen worden (Dirnagl 2006).

Im Folgenden möchte ich die Schwächen der vorliegenden Studien diskutieren. Diese umfassen sowohl allgemeine Limitationen der verwendeten Methoden, als auch Aspekte der einzelnen Experimente.

Magnetresonanztomographische Charakterisierung

In der verwendeten MRT-Methodik ist eine genaue Abgrenzung der neuroanatomischen Strukturen nicht vollständig möglich. Dies liegt zum einen an einer eingeschränkten Auflösung, obwohl diese bereits vergleichbar exzellent ist. Die Seitenvergleichbarkeit war zum anderen nicht vollständig möglich, da kontralateral keine Läsion zu demarkieren war und durch die Lagerung der Tiere eine mögliche Asymmetrie des Bildes nicht vollkommen ausgeschlossen werden konnte.

In den Experimenten sind variable Infarktgrößen nicht berücksichtigt worden. Die Einschlusskriterien beinhalteten, dass mindestens ein striataler Infarkt vorliegen musste. Histologisch wurde das Vorliegen einer Infarktnekrose jeweils bestätigt. Möglicherweise haben

kortikostriatale Infarkte quantitativ einen anderen Effekt auf die ipsilaterale SN als reine striatale Infarkte. Es gibt Hinweise, dass auch die Größe des striatalen Infarktes selbst eine Rolle spielt: so beobachteten Saji et al., dass nach Infarkt des Nucleus caudatus zwar eine Volumenreduktion der SNr stattfand, jedoch keine neuronale Degeneration. Bei ischämischer Beteiligung des Nucleus caudatus *und* des Globus pallidus fand hingegen auch eine Neurodegeneration statt (Saji et al. 1994).

Histologische Charakterisierung

Histologisch ist eine präzise Abgrenzung der Strukturen mit den verwendeten Methoden nicht vollständig möglich. Es wurde in den vorliegenden Studien auf eine Differenzierung zwischen SNr und SNc zunächst verzichtet, was in zukünftigen Studien jedoch wünschenswert wäre.

Die Vergleichbarkeit der ipsilateralen mit der kontralateralen Seite ist teilweise eingeschränkt: aufgrund der histologischen Schnitttechnik ist eine vollständige Symmetrie der Frontalebene nicht gewährleistet. Zudem findet im Gegensatz zur kontralateralen Seite eine Volumenverminderung der ipsilateralen SN statt.

Therapeutische Intervention

Unsere Studien zur neuroprotektiven Wirksamkeit von FK506 und MK-801 berücksichtigen jeweils eine Dosierung und einen Zeitpunkt des Applikationsbeginns. Um ein genaueres Bild zu erhalten, müssen weitere Untersuchungen mit anderen Dosierungen und Applikationszeiten durchgeführt werden.

5.3 Ausblick

Wir hoffen mit unseren Untersuchungen grundlegende deskriptive Fragen zur EPND im Mausmodell beantwortet zu haben. Natürlich stehen sie jedoch am Beginn einer Vielzahl von unbeantworteten Fragen. Ich möchte im letzten Abschnitt auf einige Ansätze und Fragen hinweisen, die im Zusammenhang mit der EPND von besonderem Interesse sind.

Charakterisierung

Die Charakterisierung des Phänomens kann sich an zwei größeren Fragenbereichen orientieren:

(1) Welche Strukturen sind betroffen? (2) Welche Zellen und Substanzen sind an der Pathophysiologie beteiligt?

(1) Die Differenzierung der neuroanatomischen Strukturen erfordert einen präzisen Abgleich mit standardisierten Mausatlanten. Um diesen tatsächlich zu gewährleisten, wäre ein digitaler Atlas für Histologie und MRT notwendig, der an das variable Volumen der individuellen Maushirne adaptierbar ist.

Es besteht kein Konsens, ob nach Schädigung des Striatums hauptsächlich die SNr oder die SNc betroffen ist. Die Beteiligung dopaminerger Neurone weist auf eine Läsion in der SNc hin, lässt jedoch keine Folgerung bzgl. der SNr zu. Hierzu müssten ebenfalls präzise anatomische Studien erfolgen.

Das nigrostriatale dopaminerge System umfasst dopaminerge Neurone der SN sowie dopaminerge Rezeptoren im Striatum. Eine verminderte Dopaminkonzentration im Striatum scheint bei dem Phänomen der EPND einen präsynaptischen Dopaminmangel sowie eine postsynaptische Aufnahmeminderung als Ursache zu haben. Um das Verhältnis genauer zu untersuchen, bieten sich bildgebende Methoden an wie das PET oder SPECT. Derzeit finden diese vor allem in der

Parkinsondiagnostik sowie in der klinischen und experimentellen Parkinsonforschung Anwendung (Cummings et al. 2011; Toomey et al. 2012).

(2) Ein Fokus weiterer Studien sollte auf der Wirkung der beteiligten inflammatorischen Zellen liegen. Weiter oben wurde angedeutet, dass aus einer Quantifizierung der Iba-1 positiven Zellen allein nicht sichtbar ist, ob es sich um zerebrale Mikroglia oder periphere Makrophagen handelt. Möglicherweise ist eine Makrophagen-Infiltration mit der Prognose korreliert.

In diesem Zusammenhang steht auch die Frage, ob und zu welchen Zeitpunkten die Bluthirnschranke im Bereich der SN permeabel ist. In Bezug auf das Phänomen der EPND in der SN gibt es hierzu bisher keine Studien.

Zur Beantwortung dieser Fragen sind vielversprechende Methoden verfügbar, die in den letzten Jahren signifikant weiter entwickelt worden sind. So kommen zum einen MRT-Methoden in Betracht, die sich des gut etablierten Kontrastmittels Gadolinium bedienen, oder aber SPIO bzw. USPIO-Partikel (Stoll und Bendszus 2009). Die letzteren Abkürzungen stehen für sogenannte superparamagnetic bzw. ultrasmall particles of iron oxide und bezeichnen Eisenoxidpartikel, die sich zur Darstellung von migrierenden Inflammationszellen eignen können. Zum anderen sind zunehmend auch spezifische Tracer für SPECT- und PET-Methoden verfügbar (Wunder, Klohs und Dirnagl 2009).

Neben Studien zu den zellulären Bestandteilen der Immunreaktion in der SN gibt es, wie einleitend bereits angedeutet, Untersuchungen zu den löslichen Substanzen TNF α und IL-6. Diese sind bisher nur im Rattenmodell durchgeführt worden. Auch hier stellt sich weiterhin vor allem die Frage, ob sie neurodegenerativ oder neuroprotektiv wirken und wie sie regulierbar wären.

Substanz P ist ebenfalls an der Immunreaktion beteiligt. Hierzu gibt es Studien im Mausmodell, die zeigen, dass ein ischämisches Ereignis im Striatum zu einer Verminderung von Substanz P in der ipsilateralen SN führt und es erst danach zu einer inflammatorischen Reaktion und einer Neurodegeneration kommt (Rodriguez-Grande et al. 2013). Hier könnten sich sinnvollerweise Knock-Out Studien anschließen.

Funktionelle Relevanz

Die SN ist aufgrund ihrer neuroanatomischen Vernetzung eine wichtige funktionelle Einheit, die sowohl innerhalb des limbischen Systems als auch innerhalb der Basalganglien eine Rolle spielt. Die EPND in der SN ist möglicherweise (1) mit der PSD assoziiert. Zum anderen können (2) Hypothesen zu parkinsonoiden Bewegungsstörungen vaskulärer Genese aufgestellt werden.

(1) Kronenberg et al. haben im MCAo-Mausmodell gezeigt, dass eine Citalopram-Gabe ab Tag 7 ein besseres Outcome in etablierten Verhaltenstests herbeiführt. Dazu zählten die quantitative Erhebung von Spontanaktivität, Angst und Anhedonie. Diese dienen insbesondere zur Einschätzung depressiven Verhaltens. Citalopram führte ebenfalls zu einer Protektion dopaminergener Neurone in der ipsilateralen SN (Kronenberg et al. 2012). Dies ist hinweisend darauf, dass die EPND an der Pathophysiologie der PSD beteiligt ist. Bisher ist diese Assoziation jedoch ungenügend erklärt (Baron et al. 2014) An diese Ergebnisse können sich weitere Untersuchungen anschließen, die erklären, auf welche Weise genau Citalopram eine EPND vermindert. Diese können gleichzeitig Aufschluss über pathophysiologische Mechanismen der EPND geben. Des Weiteren verweisen Kronenberg et al. auf klinische Studien, die zeigen, dass Antidepressiva vom Typ der SSRIs im Falle einer PSD nicht allein eine antidepressive Wirkung zeigen, sondern auch motorische Funktionen nach Schlaganfall verbessern. Damit sei die weitere Erforschung des funktionellen Phänotyps nach Schlaganfall, sowie der neuroprotektiven Wirkung von Antidepressiva vielversprechend in Hinblick auf die Translation bzw. Übersetzbarkeit von experimentellen Erkenntnissen auf die klinische Anwendung (Kronenberg et al. 2014).

(2) Die sensomotorische Testung der EPND im Mausmodell steht noch am Anfang. Nach einer exzitatorischen striatalen Läsion gibt es zum einen Hinweise, dass der GABA-Agonist Muscimol zu einer geringeren Verbesserung des sensomotorischen Outcomes führt (Schallert, Jones und Lindner 1990). Andererseits führt eine STN-Ablation vor der Läsion zu einer Umkehrung asymmetrischer Bewegungsstörungen (Saji et al. 1997). Die Rolle der exzitatorischen und

inhibitorischen Inputs bleibt hierbei unklar. Zudem gibt es hierzu keine Studien zur dopaminergen Neurodegeneration nach MCAo.

Zusätzlich zu den üblichen sensomotorischen Tests wären spezifische Tests für das nigrostriatale System hilfreich. Solche finden bisher in der Parkinsonforschung Verwendung. Es bietet sich somit an, diese für das MCAo-Mausmodell zu modifizieren.

Auf allgemeine Probleme sensomotorischer Tests im MCAo-Mausmodell ist ausführlich von Balkaya et al. hingewiesen worden: häufig werden sie inadäquat von Rattenmodellen übernommen. Zudem sind sie kaum standardisiert. Dennoch sind sie notwendig zur Einschätzung des funktionellen Outcomes, insbesondere nach therapeutischen Interventionen (Balkaya et al. 2013).

Die funktionelle Relevanz der EPND in der SN kann nur eingeschätzt werden, wenn die Funktion der SN isoliert betrachtet werden kann. Dies stellt ein Problem dar, da auch das Striatum betroffen ist. Es muss also eine Kontrolle etabliert werden, in der eine spezifische Neuroprotektion der SN nach striatalem Infarkt gewährleistet ist. Nach den Ergebnissen von Kronenberg et al. bietet sich Citalopram an (Kronenberg et al. 2012). Nach unseren Ergebnissen kann auch MK-801 in Betracht gezogen werden. Allerdings ist hierbei die schädigende Wirkung von MK-801 zu berücksichtigen.

Neuroprotektion

Die Erforschung subakut neuroprotektiver Substanzen im Rahmen der SN hat mindestens drei Gründe: (1) zuvorderst steht das Interesse an klinisch einsetzbaren Neuroprotektiva nach Schlaganfall, (2) in experimentellen Untersuchungen sind neuroprotektive Substanzen notwendig zum Verständnis der funktionellen Relevanz der EPND, und (3) mithilfe neuroprotektiver Substanzen lassen sich in experimentellen Untersuchungen die zugrundeliegenden Mechanismen der EPND besser verstehen.

In einem aktuellen Review zur PSD führen Kronenberg et al. die neuroprotektiven Eigenschaften von Antidepressiva wie Citalopram an, die über die antidepressive Wirkung hinausgehen. Dabei hat sich bereits sowohl in klinischen als auch in tierexperimentellen Studien gezeigt, dass sie auch nach subakuter Gabe einen positiven Effekt auf die motorische Funktionsrestitution haben. Damit sind sie als subakut einsetzbare Neuroprotektiva äußerst interessant (Kronenberg et al. 2014).

Im Anschluss an die Ergebnisse unserer Studien lässt sich FK506 nicht als subakutes Neuroprotektivum bestätigen. Wir können jedoch nicht ausschließen, dass es in höherer Dosierung einen positiven Effekt haben könnte.

Wir konnten zeigen, dass MK-801 nach subakuter Applikation einen positiven Effekt hat. Somit können wir die Beteiligung eines exzitotoxischen Mechanismus bei der EPND bestätigen. Da MK-801 allerdings auch neurotoxische Effekte aufgewiesen hat, eignet es sich weniger für funktionelle Studien und nicht für den klinischen Einsatz.

Eine weitere Substanz, die in den exzitotoxischen Mechanismus eingreift, ist der GABA-Agonist Muscimol. Dieser zeigte bereits einen neuroprotektiven Effekt auf die SN, wenn es 24 Stunden nach striatalem Infarkt appliziert wird (Yamada et al. 1996). Es sollten sich hier Studien anschließen, die den Effekt einer subakuten Gabe von Muscimol untersuchen.

Als weitere Untersuchungsgegenstände sind körper-eigene Neuroprotektiva von Interesse, die in Zusammenhang mit einer zerebralen exzitotoxischen Schädigung stehen. So gibt es im Rattenmodell bereits erste Untersuchungen zum Brain-Derived-Neurotrophic-Factor (BDNF) in der ipsilateralen SN nach striataler Läsion. Wird das Striatum exzitotoxisch geschädigt, kommt es zu einem Anstieg von BDNF. Es wurde beobachtet, dass bei ausbleibendem Anstieg von BDNF die dopaminerge Neurodegeneration in der SN geringer war (Canudas et al. 2005; Volpe, Wildmann und Altar 1998).

In dieser Arbeit habe ich den Effekt einer anti-exzitotoxischen und einer anti-inflammatorischen Substanz untersucht. Es gibt jedoch bereits auch deutliche Hinweise auf die neuroprotektive

Wirksamkeit der anti-apoptotischen Caspase-Inhibitoren z-VAD.FMK und z-DEVD.FMK. Diese sind im murinen EPND-Modell bisher nach akuter Gabe bis zu 6 Stunden nach MCAo untersucht worden (Endres et al. 1998). Eine Untersuchung zur subakuten Wirksamkeit steht noch aus.

Literaturverzeichnis

- Adeoye, O., Hornung, R., Khatri, P. und Kleindorfer, D. 2011. "Recombinant Tissue-type Plasminogen Activator Use for Ischemic Stroke in the United States: a Doubling of Treatment Rates over the Course of 5 Years." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 42 (7): 1952–55.
- Amantea, D., Nappi, G., Bernardi, G., Bagetta, G. und Corasaniti, M. T. 2009. "Post-ischemic Brain Damage: Pathophysiology and Role of Inflammatory Mediators." *The FEBS Journal* 276 (1): 13–26.
- Aronowski, J., Grotta, J. C., Strong, R. und Waxham, M. N. 2000. "Interplay Between the Gamma Isoform of PKC and Calcineurin in Regulation of Vulnerability to Focal Cerebral Ischemia." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20 (2): 343–49.
- Balkaya, M., Kröber, J. M., Rex, A. und Endres, M. 2013. "Assessing Post-stroke Behavior in Mouse Models of Focal Ischemia." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33 (3): 330–38.
- Baron, J.-C., Yamauchi, H., Fujioka, M. und Endres, M. 2014. "Selective Neuronal Loss in Ischemic Stroke and Cerebrovascular Disease." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34 (1): 2–18.
- Bederson, J. B., Pitts, L.H., Tsuji, M., Nishimura, M. C., Davis, R. L. und Bartkowski, H. 1986. "Rat Middle Cerebral Artery Occlusion: Evaluation of the Model and Development of a Neurologic Examination." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 17 (3): 472–76.
- Benninghoff, A., and Drenckhahn, D. 2004. „Anatomie. 2. Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut.“ *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Schwarzenberg.*
- Block, F., Loos, M., Frohn, C. und Schwarz, M. 2004. "Association Between Inflammation and Nigral Neuronal Damage Following Striatal Excitotoxic Lesion." *Brain Research* 998 (1): 29–35.
- Block, F., Dihné, M. und Loos, M. 2005. "Inflammation in Areas of Remote Changes Following Focal Brain Lesion." *Progress in Neurobiology* 75 (5): 342–65.
- Böhm, K. 2009. „Gesundheit und Krankheit im Alter.“ *Berlin: Robert-Koch-Inst.*
- Bolam, J. P. und Smith, Y. 1990. "The GABA and Substance P Input to Dopaminergic Neurones in the Substantia Nigra of the Rat." *Brain Research* 529 (1-2): 57–78.

- Borlongan, C. V., Martinez, R., Shytle, R. D., Freeman, T. B., Cahill, D. W. und Sanberg, P. R. 1995. "Striatal Dopamine-mediated Motor Behavior Is Altered Following Occlusion of the Middle Cerebral Artery." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 52 (1): 225–29.
- Brecht, S., Waetzig, V., Hidding, U., Hanisch, U.-W., Walther, M., Herdegen, T. und Neiss, W. F. 2009. "FK506 Protects Against Various Immune Responses and Secondary Degeneration Following Cerebral Ischemia." *Anatomical Record* 292 (12): 1993–2001.
- Canudas, A. M., Pezzi, S., Canals, J. M., Pallàs, M. und Alberch, J. 2005. "Endogenous Brain-derived Neurotrophic Factor Protects Dopaminergic Nigral Neurons Against Transneuronal Degeneration Induced by Striatal Excitotoxic Injury." *Brain Research. Molecular Brain Research* 134 (1): 147–54.
- Cowan, W. M. 1970. "Anterograde and Retrograde Transneuronal Degeneration in the Central and Peripheral Nervous System." In *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*, edited by Walle J. H. Nauta and Sven O. E. Ebbesson, 217–51. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Cummings, J. L., Henchcliffe, C., Schaier, S., Simuni, T., Waxman, A. und Kemp, P. 2011. "The Role of Dopaminergic Imaging in Patients with Symptoms of Dopaminergic System Neurodegeneration." *Brain: a Journal of Neurology* 134 (Pt 11): 3146–66.
- Davis, S. M. und Donnan, G. A. 2012. "Clinical Practice. Secondary Prevention after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack." *The New England Journal of Medicine* 366 (20): 1914–22.
- DeGiorgio, L. A., Dibinis, C., Milner, T. A., Saji, M. und Volpe, B. T.. 1998. "Histological and Temporal Characteristics of Nigral Transneuronal Degeneration after Striatal Injury." *Brain Research* 795 (1-2): 1–9.
- DeGiorgio, L. A., DeGiorgio, N. und Volpe, B.T. 1999. "Dizocilpine Maleate, MK-801, but Not 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline, NBQX, Prevents Transneuronal Degeneration of Nigral Neurons after Neurotoxic Striatal-pallidal Lesion." *Neuroscience* 90 (1): 79–85.
- Diener, H.-C. 2012. „Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.“ *Stuttgart; New York, NY: Thieme.*
- Dihné, M., und Block, F. 2001. "Focal Ischemia Induces Transient Expression of IL-6 in the Substantia Nigra Pars Reticulata." *Brain Research* 889 (1-2): 165–73.

- Dirnagl, U., Iadecola, C. und Moskowitz, M. A. 1999. "Pathobiology of Ischaemic Stroke: An Integrated View." *Trends in Neurosciences* 22 (9): 391–97.
- Dirnagl, U. 2004. "Inflammation in Stroke: The Good, the Bad, and the Unknown." *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, no. 47: 87–99.
- Dirnagl, U. 2006. "Bench to Bedside: The Quest for Quality in Experimental Stroke Research." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26 (12): 1465–78.
- Donnan, G. A., Fisher, M., Macleod, M. und Davis, S. M. 2008. "Stroke." *Lancet* 371 (9624): 1612–23.
- Easton, J. D., Saver J. L., Albers, G. W., Alberts, M. J., Chaturvedi, S., Feldmann, E., Hatsukami, T. S. et al. 2009. "Definition and Evaluation of Transient Ischemic Attack: a Scientific Statement for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology Affirms the Value of This Statement as an Educational Tool for Neurologists." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 40 (6): 2276–93.
- Endres, M., Namura, S., Shimizu-Sasamata, M., Waeber, C., Zhang, L., Gómez-Isla, T., Hyman, B. T. und Moskowitz, M. A. 1998. "Attenuation of Delayed Neuronal Death after Mild Focal Ischemia in Mice by Inhibition of the Caspase Family." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18 (3): 238–47.
- Endres, M. und Dirnagl, U. 2002. "Ischemia and Stroke." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 513: 455–73.
- Endres, M., Engelhardt, B., Koistinaho, J., Lindvall, O., Meairs, S., Mohr, J. P., Planas, A. et al. 2008. "Improving Outcome after Stroke: Overcoming the Translational Roadblock." *Cerebrovascular Diseases* 25 (3): 268–78.
- Endres, M., Heuschmann, P. U., Laufs, U. und Hakim, A. M. 2011. "Primary Prevention of Stroke: Blood Pressure, Lipids, and Heart Failure." *European Heart Journal* 32 (5): 545–52.
- Enzmann, G., Mysiorek, C., Gorina, R., Cheng, Y.-J., Ghavampour, S., Hannocks, M.-J., Prinz, V. et al. 2013. "The Neurovascular Unit as a Selective Barrier to Polymorphonuclear Granulocyte (PMN) Infiltration into the Brain after Ischemic Injury." *Acta Neuropathologica* 125 (3): 395–412.

- European Registers of Stroke (EROS) Investigators, Heuschmann, P. U., Di Carlo, A., Bejot, Y., Rastenyte, D., Ryglewicz, D., Sarti, C., Torrent, M. und Wolfe, C. D. A. 2009. "Incidence of Stroke in Europe at the Beginning of the 21st Century." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 40 (5): 1557–63.
- Färber, K., Markworth, S., Pannasch, U., Nolte, C., Prinz, V., Kronenberg, G., Gertz, K. et al. 2008. "The Ectonucleotidase cd39/ENTPDase1 Modulates Purinergic-mediated Microglial Migration." *Glia* 56 (3): 331–41.
- Forno, L. S. 1983. "Reaction of the Substantia Nigra to Massive Basal Ganglia Infarction." *Acta Neuropathologica* 62 (1-2): 96–102.
- Gaul, C. und Endres, M. 2012. „Harrisons Neurologie.“ *London: McGraw-Hill*.
- Gelderblom, M., Leyboldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C.-U., Siler, D. A., Arumugam, T. V. et al. 2009. "Temporal and Spatial Dynamics of Cerebral Immune Cell Accumulation in Stroke." *Stroke* 40 (5): 1849–57.
- Gerfen, C. R. und Surmeier, D. J. 2011. "Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine." *Annual Review of Neuroscience* 34: 441–66.
- Gertz, K., Priller, J., Kronenberg, G., Fink, K. B., Winter, B., Schröck, H., Ji, S. et al. 2006. "Physical Activity Improves Long-term Stroke Outcome via Endothelial Nitric Oxide Synthase-dependent Augmentation of Neovascularization and Cerebral Blood Flow." *Circulation Research* 99 (10): 1132–40.
- Gertz, K., Kronenberg, G., Kalin, R. E., Baldinger, T., Werner C., Balkaya, M., Eom, G. D. et al. 2012. "Essential Role of Interleukin-6 in Post-stroke Angiogenesis." *Brain* 135 (6): 1964–80.
- Giles, M. F. und Rothwell, P. M. 2007. "Risk of Stroke Early after Transient Ischaemic Attack: a Systematic Review and Meta-analysis." *Lancet Neurology* 6 (12): 1063–72.
- Giles, M. F., Albers G. W., Amarenco, P., Arsava, E. M., Asimos, A. W., Ay, H., Calvet, D. et al. 2011. "Early Stroke Risk and ABCD2 Score Performance in Tissue- Vs Time-defined TIA: a Multicenter Study." *Neurology* 77 (13): 1222–28.

- Go, A. S., Mozaffarian, D., Roger, V. L., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., Bravata, D. M. et al. 2013. "Heart Disease and Stroke Statistics--2013 Update: a Report from the American Heart Association." *Circulation* 127 (1): e6–e245.
- González, R. G. 2012. "Clinical MRI of Acute Ischemic Stroke." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 36 (2): 259–71.
- Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., Larrue, V. et al. 2008. "Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke." *The New England Journal of Medicine* 359 (13): 1317–29.
- Handley, A., Medcalf, P., Hellier, K. und Dutta, D. 2009. "Movement Disorders after Stroke." *Age and Ageing* 38 (3): 260–66.
- Hatfield, R. H., Gill, R. und Brazell, C. 1992. "The Dose-response Relationship and Therapeutic Window for Dizocilpine (MK-801) in a Rat Focal Ischaemia Model." *European Journal of Pharmacology* 216 (1): 1–7.
- Heiss, W.-D. 2012. "The Ischemic Penumbra: How Does Tissue Injury Evolve?" *Annals of the New York Academy of Sciences* 1268 (September): 26–34.
- Heuschmann, P., Busse, O., Wagner, M., Endres, M., Villringer, A., Röther, J., Kolominsky-Rabas, P. und Berger, K. 2010. "Schlaganfallhäufigkeit Und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland." *Aktuelle Neurologie* 37 (07): 333–40.
- Heuschmann, P. U., Neuhauser, H. K. und Endres, M. 2011. "Entwicklung von Mortalität Und Morbidität Vaskulärer Erkrankungen." *Der Nervenarzt* 82 (2): 145–52.
- Janjua, N. 2012. "Use of Neuroimaging to Guide the Treatment of Patients Beyond the 8-hour Time Window." *Neurology* 79 (13 Suppl 1): S95–99.
- Katchanov, J., Harms, C., Gertz, K., Hauck, L., Waeber, C., Hirt, L., Priller, J. et al. 2001. "Mild Cerebral Ischemia Induces Loss of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors and Activation of Cell Cycle Machinery before Delayed Neuronal Cell Death." *The Journal of Neuroscience* 21 (14): 5045–53.

- Katchanov, J., Waeber, C., Gertz, K., Gietz, A., Winter, B., Brück, W., Dirnagl, U., Veh, R. W. und Endres, M. 2003. "Selective Neuronal Vulnerability Following Mild Focal Brain Ischemia in the Mouse." *Brain Pathology* 13 (4): 452–64.
- Kleindorfer, D., Kissela, B., Schneider, A., Woo, D., Khoury, J., Miller, R., Alwell, K. et al. 2004. "Eligibility for Recombinant Tissue Plasminogen Activator in Acute Ischemic Stroke: a Population-based Study." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 35 (2): e27–29.
- Kloska, S. P., Wintermark, M., Engelhorn, T. und Fiebich, J.B. 2010. "Acute Stroke Magnetic Resonance Imaging: Current Status and Future Perspective." *Neuroradiology* 52 (3): 189–201.
- Kolominsky-Rabas, P. L., Heuschmann, P. U., Marschall, D., Emmert, M., Baltzer, N., Neundörfer, B., Schöffski, O. und Krobot, K. J. 2006. "Lifetime Cost of Ischemic Stroke in Germany: Results and National Projections from a Population-based Stroke Registry: The Erlangen Stroke Project." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 37 (5): 1179–83.
- Kotila, M., Numminen, H., Waltimo, O. und Kaste, M. 1998. "Depression after Stroke: Results of the FINNSTROKE Study." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 29 (2): 368–72.
- Krafft, P. R., Bailey, E. L., Lekic, T., Rolland, W. B., Altay, O., Tang, J., Wardlaw, J. M., Zhang, J. H. und Sudlow, C. L. M. 2012. "Etiology of Stroke and Choice of Models." *International Journal of Stroke* 7 (5): 398–406.
- Krammer, E. B. 1980. "Anterograde and Transsynaptic Degeneration 'En Cascade' in Basal Ganglia Induced by Intrastratial Injection of Kainic Acid: An Animal Analogue of Huntington's Disease." *Brain Research* 196 (1): 209–21.
- Kronenberg, G., Katchanov, J. und Endres, M. 2006. "Post-stroke depression: clinical aspects, epidemiology, therapy, and pathophysiology." *Der Nervenarzt* 77 (10): 1176, 1179–82, 1184–85.
- Kronenberg, G., Balkaya, M., Prinz, V., Gertz, K., Ji, S., Kirste, I., Heuser, I. et al. 2012. "Exofocal Dopaminergic Degeneration as Antidepressant Target in Mouse Model of Poststroke Depression." *Biological Psychiatry* 72 (4): 273–81.
- Kronenberg, G., Gertz, K., Heinz, A. und Endres, M. 2014. "Of Mice and Men: Modelling Post-stroke Depression Experimentally." *British Journal of Pharmacology* 171 (20): 4673–89.

- Kunz, A., Dirnagl, U. und Mergenthaler, P. 2010. "Acute Pathophysiological Processes after Ischaemic and Traumatic Brain Injury." *Best Practice & Research. Clinical Anaesthesiology* 24 (4): 495–509.
- Lambertsen, K. L., Biber, K. und Finsen, B. 2012. "Inflammatory Cytokines in Experimental and Human Stroke." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32 (9): 1677–98.
- Langhorne, P., Williams, B. O., Gilchrist, W. und Howie, K. 1993. "Do Stroke Units Save Lives?" *Lancet* 342 (8868): 395–98.
- Langhorne, P., Sandercock, P. und Prasad, K. 2009. "Evidence-based Practice for Stroke." *Lancet Neurology* 8 (4): 308–9.
- Langhorne, P., Bernhardt, J. und Kwakkel, G. 2011. "Stroke Rehabilitation." *Lancet* 377 (9778): 1693–1702.
- Liu, F. und McCullough, L. D. 2011. "Middle Cerebral Artery Occlusion Model in Rodents: Methods and Potential Pitfalls." *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2011: 464701.
- Loos, M., Dihné, M. und Block, F. 2003. "Tumor Necrosis Factor-alpha Expression in Areas of Remote Degeneration Following Middle Cerebral Artery Occlusion of the Rat." *Neuroscience* 122 (2): 373–80.
- Lundberg, C, K Wictorin, and A Björklund. 1994. "Retrograde Degenerative Changes in the Substantia Nigra Pars Compacta Following an Excitotoxic Lesion of the Striatum." *Brain Research* 644 (2): 205–12.
- Ma, J., Endres, M. und Moskowitz, M. A. 1998. "Synergistic Effects of Caspase Inhibitors and MK-801 in Brain Injury after Transient Focal Cerebral Ischaemia in Mice." *British Journal of Pharmacology* 124 (4): 756–62.
- Macleod, M. R., O'Collins, T., Horkey, L. L., Howells, D. W. und Donnan, G. A. 2005. "Systematic Review and Metaanalysis of the Efficacy of FK506 in Experimental Stroke." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25 (6): 713–21.
- McCarter, J. F., McGregor, A. L., Jones, P. A. und Sharkey, J. 2001. "FK 506 Protects Brain Tissue in Animal Models of Stroke." *Transplantation Proceedings* 33 (3): 2390–92.
- Meyer, J. S., Obara, K. und Muramatsu, K. 1993. "Diaschisis." *Neurological Research* 15 (6): 362–66.

- Mezzapesa, D. M., Petruzzellis, M., Lucivero, V., Prontera, M., Tinelli, A., Sancilio, M., Carella, A. und Federico, F. 2006. "Multimodal MR Examination in Acute Ischemic Stroke." *Neuroradiology* 48 (4): 238–46.
- Minagar, A. 2011. „Neuroinflammation.“ *London ; Burlington, MA: Elsevier.*
- Mohan, K. M., Wolfe, C. D. A., Rudd, A. G., Heuschmann, P. U., Kolominsky-Rabas, P. L. Und Grieve, A. P. 2011. "Risk and Cumulative Risk of Stroke Recurrence: a Systematic Review and Meta-analysis." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 42 (5): 1489–94.
- Moskowitz, M. A., Lo, E. H. und Iadecola, C. 2010. "The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments." *Neuron* 67 (2): 181–98.
- Nagasawa, H., und Kogure, K. 1990. "Exo-focal Postischemic Neuronal Death in the Rat Brain." *Brain Research* 524 (2): 196–202.
- Nakajima, M., Hirano, T., Terasaki, T. und Uchino, M. 2010. "Signal Change of the Substantia Nigra on Diffusion-weighted Imaging Following Striatal Infarction." *Internal Medicine (Tokyo, Japan)* 49 (1): 65–68.
- Nakajima, M., Inatomi, Y., Okigawa, T., Yonehara, T. und Hirano, T. 2013. "Secondary Signal Change and an Apparent Diffusion Coefficient Decrease of the Substantia Nigra after Striatal Infarction." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 44 (1): 213–16.
- Nakane, M., Teraoka, A., Asato, R. und Tamura, A. 1992. "Degeneration of the Ipsilateral Substantia Nigra Following Cerebral Infarction in the Striatum." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 23 (3): 328–32.
- Nakane, M., Tamura, A., Nagaoka, T. und Hirakawa, K. 1997. "MR Detection of Secondary Changes Remote from Ischemia: Preliminary Observations after Occlusion of the Middle Cerebral Artery in Rats." *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 18 (5): 945–50.
- Nakane, M., Tamura, A., Miyasaka, N., Nagaoka, T. und Kuroiwa, T. 2001. "Astrocytic Swelling in the Ipsilateral Substantia Nigra after Occlusion of the Middle Cerebral Artery in Rats." *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 22 (4): 660–63.

- Nakanishi, H., Tamura, A., Kawai, K. und Yamamoto, K. 1997. "Electrophysiological Studies of Rat Substantia Nigra Neurons in an in Vitro Slice Preparation after Middle Cerebral Artery Occlusion." *Neuroscience* 77 (4): 1021–28.
- Napoli, I., und Neumann, H. 2009. "Microglial Clearance Function in Health and Disease." *Neuroscience* 158 (3): 1030–38.
- Nishigaya, K., Yoshida, Y., Sasuga, M., Nukui, H. und Ooneda, G. 1991. "Effect of Recirculation on Exacerbation of Ischemic Vascular Lesions in Rat Brain." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 22 (5): 635–42.
- Ohe, Y., Uchino, A., Horiuchi, Y., Maruyama, H., Deguchi, I., Fukuoka, T., Kato, Y., Nagoya, H., Dembo, T. und Norio Tanahashi. 2013. "Magnetic Resonance Imaging Investigation of Secondary Degeneration of the Mesencephalic Substantia Nigra after Cerebral Infarction." *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association* 22 (1): 58–65.
- Olney, J. W., Labruyere, J. und Price, M. T. 1989. "Pathological Changes Induced in Cerebrocortical Neurons by Phencyclidine and Related Drugs." *Science* 244 (4910): 1360–62.
- Pasinetti, G. M., Morgan, D. G. and Finch, C. E. 1991. "Disappearance of GAD-mRNA and Tyrosine Hydroxylase in Substantia Nigra Following Striatal Ibotenic Acid Lesions: Evidence for Transneuronal Regression." *Experimental Neurology* 112 (2): 131–39.
- Rodriguez-Grande, B., Blackabey, V., Gittens, B., Pinteaux, E. und Denes, A. 2013. "Loss of Substance P and Inflammation Precede Delayed Neurodegeneration in the Substantia Nigra after Cerebral Ischemia." *Brain, Behavior, and Immunity* 29 (March): 51–61.
- Rothwell, P. M., Algra, A. und Amarenco, P. 2011. "Medical Treatment in Acute and Long-term Secondary Prevention after Transient Ischaemic Attack and Ischaemic Stroke." *Lancet* 377 (9778): 1681–92.
- Röther, J. 2001. "CT and MRI in the Diagnosis of Acute Stroke and Their Role in Thrombolysis." *Thrombosis Research* 103 Suppl 1 (September): S125–133.
- Saji, M. und Reis, D. J. 1987. "Delayed Transneuronal Death of Substantia Nigra Neurons Prevented by Gamma-aminobutyric Acid Agonist." *Science* 235 (4784): 66–69.

- Saji, M., Cohen, M., Blau, A. D., Wessel, T. C. und Volpe, B. T. 1994. "Transient Forebrain Ischemia Induces Delayed Injury in the Substantia Nigra Reticulata: Degeneration of GABA Neurons, Compensatory Expression of GAD mRNA." *Brain Research* 643 (1-2): 234–44.
- Saji, M., Blau, A. D. und Volpe, B. T. 1996. "Prevention of Transneuronal Degeneration of Neurons in the Substantia Nigra Reticulata by Ablation of the Subthalamic Nucleus." *Experimental Neurology* 141 (1): 120–29.
- Saji, M., Endo, Y., Miyanishi, T., Volpe, B. T. und Ohno, K. 1997. "Behavioral Correlates of Transneuronal Degeneration of Substantia Nigra Reticulata Neurons Are Reversed by Ablation of the Subthalamic Nucleus." *Behavioural Brain Research* 84 (1-2): 63–71.
- Schallert, T., Jones, T. A. und Lindner, M. D. 1990. "Multilevel Transneuronal Degeneration after Brain Damage. Behavioral Events and Effects of Anticonvulsant Gamma-aminobutyric Acid-related Drugs." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 21 (11 Suppl): III143–146.
- Scimeca, J. M. und Badre, D. 2012. "Striatal Contributions to Declarative Memory Retrieval." *Neuron* 75 (3): 380–92.
- Shichinohe, H., Kuroda, S., Abumiya, T., Ikeda, J., Kobayashi, T., Yoshimoto, T. und Iwasaki, Y. 2004. "FK506 Reduces Infarct Volume Due to Permanent Focal Cerebral Ischemia by Maintaining BAD Turnover and Inhibiting Cytochrome c Release." *Brain Research* 1001 (1-2): 51–59.
- Soriano, M. A., Justicia, C., Ferrer, I., Rodríguez-Farré, E. und Planas, A. M. 1997. "Striatal Infarction in the Rat Causes a Transient Reduction of Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Ipsilateral Substantia Nigra." *Neurobiology of Disease* 4 (5): 376–85.
- Stefanis, L. und Burke, R. E. 1996. "Transneuronal Degeneration in Substantia Nigra Pars Reticulata Following Striatal Excitotoxic Injury in Adult Rat: Time-course, Distribution, and Morphology of Cell Death." *Neuroscience* 74 (4): 997–1008.
- Stoll, G., Jander, S. und Schroeter, M. 1998. "Inflammation and Glial Responses in Ischemic Brain Lesions." *Progress in Neurobiology* 56 (2): 149–71.
- Stoll, G., und Bendszus, M. 2009. "Imaging of Inflammation in the Peripheral and Central Nervous System by Magnetic Resonance Imaging." *Neuroscience* 158 (3): 1151–60.

- Suzuki, S., Tanaka, K., Nogawa, S., Nagata, E., Ito, D., Dembo, T. und Fukuuchi, Y. 1999. "Temporal Profile and Cellular Localization of Interleukin-6 Protein after Focal Cerebral Ischemia in Rats." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19 (11): 1256–62.
- Suzuki, S., Tanaka, K. und Suzuki, N. 2009. "Ambivalent Aspects of Interleukin-6 in Cerebral Ischemia: Inflammatory Versus Neurotrophic Aspects." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29 (3): 464–79.
- Tamura, A., Graham, D. I., McCulloch, J. und Teasdale, G. M. 1981. "Focal Cerebral Ischaemia in the Rat: 2. Regional Cerebral Blood Flow Determined by [14C]iodoantipyrine Autoradiography Following Middle Cerebral Artery Occlusion." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1 (1): 61–69.
- Tamura, A., Kirino, T., Sano, K., Takagi, K. und Oka, H. 1990. "Atrophy of the Ipsilateral Substantia Nigra Following Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat." *Brain Research* 510 (1): 154–57.
- Taqi, M. A., Vora, N., Callison, R. C., Lin, R. und Wolfe, T. J. 2012. "Past, Present, and Future of Endovascular Stroke Therapies." *Neurology* 79 (13 Suppl 1): S213–220.
- Tepper, J. M. und Lee, C. R. 2007. "GABAergic Control of Substantia Nigra Dopaminergic Neurons." *Progress in Brain Research* 160: 189–208.
- Toomey, J. S., Bhatia, S., Moon, L. T., Orchard, E. A., Tainter, H. H., Lokitz, L. J., Terry, T., Mathis, J. M. und Penman, A. D. 2012. "PET Imaging a MPTP-induced Mouse Model of Parkinson's Disease Using the Fluoropropyl-dihydrotrabenazine Analog [18F]-DTBZ (AV-133)." *PloS One* 7 (6): e39041.
- Tritsch, N. X. und Sabatini, B. L. 2012. "Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum." *Neuron* 76 (1): 33–50.
- Volpe, B. T., Wildmann, J. und Altar, C. A. 1998. "Brain-derived Neurotrophic Factor Prevents the Loss of Nigral Neurons Induced by Excitotoxic Striatal-pallidal Lesions." *Neuroscience* 83 (3): 741–48.
- Von Monakow, C. 1906. *Aphasie Und Diaschisis*. Veit & Comp.

- Waller, A. 1850. "Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 140 (0): 423–29.
- Wang, Q., Tang, X. N. und Yenari, M. A. 2007. "The Inflammatory Response in Stroke." *Journal of Neuroimmunology* 184 (1-2): 53–68.
- Wardlaw, J. M., Murray, V., Berge, E., del Zoppo, G., Sandercock, P., Lindley, R. L. und Cohen, G. 2012. "Recombinant Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischaemic Stroke: An Updated Systematic Review and Meta-analysis." *Lancet* 379 (9834): 2364–72.
- Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S. K., Vamanrao, A. und Uchida, N. 2012. "Whole-brain Mapping of Direct Inputs to Midbrain Dopamine Neurons." *Neuron* 74 (5): 858–73.
- Winter, B., Bert, B., Fink, H., Dirnagl, U. und Endres, M. 2004. "Dysexecutive Syndrome after Mild Cerebral Ischemia? Mice Learn Normally but Have Deficits in Strategy Switching." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 35 (1): 191–95.
- World Health Organization 2014. The top 10 causes of death. Fact sheet N°310. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (accessed December 2014).
- Wunder, A., Klohs, J. und Dirnagl, U. 2009. "Non-invasive Visualization of CNS Inflammation with Nuclear and Optical Imaging." *Neuroscience* 158 (3): 1161–73.
- Yamada, K., Goto, S., Yoshikawa, M. und Ushio, Y. 1996. "Gabaergic Transmission and Tyrosine Hydroxylase Expression in the Nigral Dopaminergic Neurons: An in Vivo Study Using a Reversible Ischemia Model of Rats." *Neuroscience* 73 (3): 783–89.
- Zahuranec, D. B. und Majersik, J. J. 2012. "Percentage of Acute Stroke Patients Eligible for Endovascular Treatment." *Neurology* 79 (13 Suppl 1): S22–25.
- Zhang, J., Zhang, Y., Xing, S., Liang, Z. und Zeng, J. 2012. "Secondary Neurodegeneration in Remote Regions after Focal Cerebral Infarction: a New Target for Stroke Management?" *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 43 (6): 1700–1705.

- Zhao, F., Kuroiwa, T., Miyasaka, N., Nagaoka, T., Nakane, M., Tamura, A. und Mizusawa, H. 2001. "Characteristic Changes in T(2)-value, Apparent Diffusion Coefficient, and Ultrastructure of Substantia Nigra Evolving Exofocal Postischemic Neuronal Death in Rats." *Brain Research* 895 (1-2): 238–44.
- Zhao, F., Kuroiwa, T., Miyasaka, N., Nagaoka, T., Nakane, M., Tamura, A. und Mizusawa, H. 2002. "Ultrastructural and MRI Study of the Substantia Nigra Evolving Exofocal Post-ischemic Neuronal Death in the Rat." *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 22 (3): 91–105.
- Zhou, F. M. und Lee, C. R. 2011. "Intrinsic and Integrative Properties of Substantia Nigra Pars Reticulata Neurons." *Neuroscience* 198 (December): 69–94.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Anna Maria Hetzer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: 'Die exofokale postischämische neuronale Degeneration in der Substantia nigra nach striatalem Infarkt im Mausmodell' selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, den 25.02.2015

Anna Maria Hetzer

Publikationen

Hetzer, Anna*; Prinz, Vincent*; Mueller, Susanne; Balkaya, Mustafa; Leithner, Christoph; Kronenberg, Golo; Endres, Matthias. MRI heralds secondary nigral lesion following brain ischemia in mice: a secondary time window for neuroprotection. (JCBFM in print).

* geteilte Erstautorschaft

Anteilserklärung

Anna Maria Hetzer hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1:

Hetzer, Anna*; Prinz, Vincent*; Mueller, Susanne; Balkaya, Mustafa; Leithner, Christoph; Kronenberg, Golo; Endres, Matthias. MRI heralds secondary nigral lesion following brain ischemia in mice: a secondary time window for neuroprotection. (JCBFM in print).

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung der in vivo Versuche; i.p. Applikation von Tacrolimus und Dizocilpin; Durchführung und Auswertung der MRT-Messungen; Gewebentnahme; Auswertung der histologischen Präparate.

*geteilte Erstautorschaft

Anna Hetzer

Prof. Dr. Matthias Endres

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias Endres für die Übergabe des Promotionsthemas, sowie die exzellente Betreuung und fortwährende Unterstützung.

Herrn Dr. Vincent Prinz möchte ich ebenfalls besonders danken für die Einführung in die Laborarbeit, sowie die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Dirnagl danke ich, dass ich die Experimente der Promotionsarbeit am Institut für experimentelle Neurologie durchführen konnte.

Bei Herrn Prof. Dr. Golo Kronenberg bedanke ich mich für die histologischen Färbungen sowie den methodischen Rat.

Herrn Ingo Przesdzing danke ich für die Einführung in die histologische Auswertung.

Frau Susanne Müller und Herrn Jan Jikeli möchte ich für die Unterstützung bei den magnetresonanztomographischen Messungen danken.

Danken möchte ich den Mitarbeitern der AG Endres, Dr. Karen Gertz, Dr. Mustafa Balkaya, Dr. Jan Kröber, Dr. Tina Baldinger, Dr. Alexander Kunz für den wissenschaftlichen Austausch und die gute Zusammenarbeit.

In ganz besonderem Maße danke ich meinen Eltern für ihren Rat und die stete Unterstützung.