

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

DISSERTATION

Langzeitanalyse der neurovaskulären Einheit  
nach ischämischem Schlaganfall  
mittels Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie

Long-term analysis of the neurovascular unit after ischemic  
stroke using two-photon fluorescence microscopy

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kim Cornelia Fiedler,  
geb. Fischer

aus München

Datum der Promotion: 29.11.2024

# 1 INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>- 2 -</b>
<b>2</b>	<b>ABBIILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>- 5 -</b>
<b>3</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>- 8 -</b>
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG IN DEUTSCHER SPRACHE</b>	<b>- 9 -</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG IN ENGLISCHER SPRACHE</b>	<b>- 11 -</b>
<b>6</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>- 13 -</b>
<b>6.1</b>	<b>Ischämischer Schlaganfall</b>	<b>- 13 -</b>
6.1.1	Definition und Inzidenz	- 13 -
6.1.2	Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls	- 13 -
6.1.3	Therapie des ischämischen Schlaganfalls	- 15 -
<b>6.2</b>	<b>Neurovaskuläre Einheit</b>	<b>- 16 -</b>
6.2.1	Aufbau und Funktion	- 16 -
6.2.2	Neurone	- 18 -
6.2.3	Astrozyten	- 20 -
6.2.4	Blutgefäße	- 23 -
<b>6.3</b>	<b><i>In vivo</i> Mikroskopie des Gehirns am Mausmodell</b>	<b>- 24 -</b>
6.3.1	Vorteile der <i>in vivo</i> Untersuchung	- 24 -
6.3.2	Wie mikroskopiert man das Gehirn <i>in vivo</i> ?	- 25 -
<b>6.4</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>- 26 -</b>
<b>7</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>- 27 -</b>
<b>7.1</b>	<b>Studiendesign</b>	<b>- 27 -</b>
<b>7.2</b>	<b>Versuchstiere: EphrinB2 lox x Thy1-YFP-CreERT2</b>	<b>- 28 -</b>
<b>7.3</b>	<b>Operationsverfahren</b>	<b>- 29 -</b>
7.3.1	Chronisch kraniales Fenster	- 29 -
7.3.1.1	PDMS-Membran als Modifikation	- 32 -
7.3.2	Distale Okklusion der A. cerebri media	- 33 -

7.3.2.1	Orientierung innerhalb des chronisch kranialen Fensters _____	- 35 -
7.3.2.2	Magnetresonanztomographie _____	- 37 -
<b>7.4</b>	<b>Intravital-Epifluoreszenz-Videomikroskopie _____</b>	<b>- 38 -</b>
<b>7.5</b>	<b>Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie _____</b>	<b>- 39 -</b>
7.5.1	Second Harmonic Generation (SHG) _____	- 40 -
7.5.2	Benutzung des Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskops _____	- 42 -
7.5.3	Größe des Aufnahme Fensters und Methode <i>Tile Scan</i> _____	- 45 -
<b>7.6</b>	<b>Fluoreszenzfarbstoffe _____</b>	<b>- 45 -</b>
7.6.1	Sulforhodamin 101 _____	- 45 -
7.6.1.1	Immunhistologische Untersuchungen _____	- 46 -
7.6.1.2	Reportertiere : FVB/N-Tg(GFAPGFP)14Mes/J _____	- 47 -
7.6.1	FITC-Dextran _____	- 49 -
7.6.2	TRITC-Dextran _____	- 49 -
7.6.3	Cascade Blue _____	- 50 -
<b>7.7</b>	<b>Datenauswertung _____</b>	<b>- 50 -</b>
7.7.1	ImageJ _____	- 50 -
7.7.2	Imaris _____	- 51 -
7.7.3	GraphPad Prism und Microsoft Excel _____	- 52 -
7.7.4	Berechnung der Gefäßdichte _____	- 52 -
<b>8</b>	<b>ERGEBNISSE _____</b>	<b>- 53 -</b>
<b>8.1</b>	<b>Aufnahmen mittels Intravital-Epifluoreszenz-Videomikroskopie _____</b>	<b>- 53 -</b>
<b>8.2</b>	<b>Aufnahmen mittels Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie _____</b>	<b>- 53 -</b>
8.2.1	Grundlegende Erkenntnisse _____	- 53 -
8.2.2	Darstellung des gesamten chronisch kranialen Fensters _____	- 56 -
<b>8.3</b>	<b>Darstellung von Neuronen _____</b>	<b>- 57 -</b>
<b>8.4</b>	<b>Darstellung von Astrozyten _____</b>	<b>- 57 -</b>
<b>8.5</b>	<b>Darstellung von Blutgefäßen _____</b>	<b>- 59 -</b>
8.5.1	Vergleich der verschiedenen Fluorophore _____	- 59 -
8.5.2	Beispielhafte Darstellung einer Untersuchungsreihe _____	- 61 -

<b>8.6</b>	<b>Analyse des Gefäßdurchmessers</b>	<b>- 63 -</b>
8.6.1	Vergleich von Schlaganfall und ShamOP	- 63 -
8.6.2	Vergleich von Infarktkern und Peri-Infarktzone	- 68 -
<b>8.7</b>	<b>Analyse der Gefäßdichte</b>	<b>- 71 -</b>
8.7.1	Vergleich von Schlaganfall und ShamOP	- 71 -
8.7.2	Vergleich von Infarktkern und Peri-Infarktzone	- 73 -
<b>9</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>- 75 -</b>
<b>9.1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>- 75 -</b>
<b>9.2</b>	<b>Diskussion der Methoden</b>	<b>- 75 -</b>
9.2.1	Chronisch kraniales Fenster	- 75 -
9.2.2	Distale Okklusion der A. cerebri media	- 77 -
9.2.3	Fluoreszenzfarbstoffe	- 78 -
9.2.3.1	YFP zur Darstellung von Neuronen	- 78 -
9.2.3.2	Fluoreszenzfarbstoffe zur Darstellung von Blutgefäßen	- 78 -
9.2.3.3	SR101 zur Darstellung von Astrozyten	- 79 -
9.2.4	Intravital-Epifluoreszenz-Videomikroskopie	- 81 -
9.2.5	Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie	- 82 -
<b>9.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>- 84 -</b>
9.3.1	Analyse von Gefäßdurchmesser und Gefäßdichte	- 84 -
9.3.2	Vergleich von Infarktkern und Peri-Infarktzone	- 84 -
<b>9.4</b>	<b>Ausblick</b>	<b>- 86 -</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>- 87 -</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG</b>	<b>- 94 -</b>
<b>12</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>- 96 -</b>
<b>13</b>	<b>PUBLIKATIONS LISTE</b>	<b>- 97 -</b>
<b>14</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>- 98 -</b>
<b>15</b>	<b>BESCHEINIGUNG STATISTIK</b>	<b>- 99 -</b>

## 2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1:** Mutmaßlicher Ablauf der Schädigungsmechanismen des ischämischen Schlaganfalls. Einzelndargestellt im Ausmaß ihrer Wirkung sind im zeitlichen Verlauf die Mechanismen Exzitotoxizität, Peri-Infarkt-Depolarisationen, Inflammation und Apoptose. Eigene Darstellung nach (Dirnagl et al., 1999).- 14 -
- Abbildung 2:** Die Komponenten der NVU bilden eine funktionelle Einheit. Gezeichnet sind hier: Endothelzellen, Neurone, Astrozyten mit astrozytischen Endfüßchen, Neurone, Tight Junctions, Mikroglia und Interneurone. Eigene Darstellung nach (Abbott et al., 2006). ..... - 17 -
- Abbildung 3:** Eine der ersten Zeichnungen einer sog. „Spinnenzelle“, heute genannt „Astrozyt“, in einem Werk aus dem Jahr 1895 (Lenhossék, 1895)..... - 20 -
- Abbildung 4:** Graphisch dargestellt ist der Versuchsaufbau, der für die systematische Datenerfassung gewählt wurde. Tag 0: OP, Tag 3, 7 und 28: Messung mittels TPLSM..... - 27 -
- Abbildung 5:** Die fertige Polydimethylsiloxane-Membran direkt nach der Herstellung und mit einer Stanze in Form gebracht. .... - 33 -
- Abbildung 6:** Die Operation der dMCAo: Links skizziert die Lage des OP-Gebiets, in der Mitte die MCA nach der Osteotomie und rechts nach der Okklusion mittels Elektrokoagulation. .... - 34 -
- Abbildung 7:** Dargestellt sind fünf Aufnahmen mittels IVM (20-fache Vergrößerung), die das gleiche Blutgefäß über einen Messzeitraum von 28 Tagen zeigen. Die Aufnahmezeitpunkte waren 24 Stunden nach der OP, 72 Stunden nach der OP, Tag 7, 14 und 28. Bei dieser Maus wurde lediglich ein CCW operiert. Das Gefäß wurde allein durch den optischen Eindruck wiedergefunden. Maßstabsleiste = 0.06 mm. .... - 35 -
- Abbildung 8:** Das Aufnahmesystem durch das CCW: Links ist schematisch die Lage des CCW in Relation zur Kalotte skizziert, in der Mitte eine photographische Aufnahme eines CCW direkt nach der OP und rechts die Einteilung in der Quadranten. Es ist zu erkennen, dass die MCA hauptsächlich den Quadrant 2 versorgt, welcher folglich mutmaßlich am meisten von der dMCAo betroffen ist. .... - 36 -
- Abbildung 9:** Beispielhaft eine Magnetresonanztomographie-Aufnahme in T2-Wichtung 24 Stunden nach dMCAo mit Darstellung des Infarktbereichs (Stern) unterhalb des CCW (Pfeil). .... - 37 -
- Abbildung 10:** Die Geräte der IVM in unserem Labor ..... - 38 -
- Abbildung 11:** Zeitverlauf der Gefäßregeneration einer Maus nach der dMCAo (Tag 1, Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 28). Maßstabsleiste = 0.06 mm. .... - 39 -
- Abbildung 12:** Zeitverlauf der Gefäßregeneration einer Maus nach der ShamOP (Tag 1, Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 28). Maßstabsleiste = 0,06 mm. .... - 39 -
- Abbildung 13:** Der Messplatz des TPLSM unserer des Deutsches Rheuma-Forschungszentrums. .... - 40 -

- Abbildung 14:** Darstellung des optischen Phänomens SHG. *Links:* die Dura mater in der TPLSM. Maßstabsleiste = 50 µm. *Rechts:* eine Rekonstruktion der Dura mater (Blau) und der darunter verlaufenden Blutgefäße (Grün). Maßstabsleiste = 100 µm..... - 41 -
- Abbildung 15:** Aufnahmen mittels CLSM eines immunhistologisch gefärbten Hirnschnitts. Das Gehirn stammt von einer Maus an Tag 28 nach Schlaganfall. Zu erkennen sind Zellkerne (Blau), Astrozyten (Rot) und Immunzellen (Grün). Rechts in 40-facher Vergrößerung und Links in 63-facher Vergrößerung. Maßstabsleiste = 50 µm..... - 47 -
- Abbildung 16:** Die Aufnahmen von Astrozyten mittels TPLSM. Links: GFAP-GFP-positive Zellen, angeregt mit einer Wellenlänge von 920 nm. Rechts: SR101-positive Zellen, angeregt mit einer Wellenlänge von 1100 nm. Maßstabsleiste = 50 µm. - 48 -
- Abbildung 17:** Kolokalisation der GFAP-positiven Zellen und der SR101-positiven Zellen. Maßstabsleiste = 50 µm..... - 49 -
- Abbildung 18:** Beispielhaft dargestellt die Rekonstruktion von Blutgefäße mit Imaris. Links die Aufnahme mittels TPLSM und rechts die entsprechende Rekonstruktion. Maßstabsleiste = 100 µm..... - 51 -
- Abbildung 19:** Messung des gleichen Bildausschnitts, mithilfe des Ti:Sa mit 850 nm (links), mit 930 nm (Mitte) und des OPO mit 1100 nm (rechts) an Tag 28 nach dMCAo. Maßstabsleiste = 50µm..... - 54 -
- Abbildung 20:** Messung des gleichen Bildausschnitts mit Line Average 1 (links) und mit Line Average 4 (rechts) an Tag 28 nach ShamOP. Mithilfe von FITC sind Blutgefäße dargestellt. Gesamtes Bild: Maßstabsleiste = 50 µm, Bildausschnitt: Maßstabsleiste = 50 µm. .... - 55 -
- Abbildung 21:** Darstellung des gesamten CCW, hier zu sehen Astrozyten einer GFAP-GFP-positiven Maus. Maßstabsleiste = 300 µm. .... - 56 -
- Abbildung 22:** Die Abbildung zeigt in zwei verschiedenen Ansichten (links Aufsicht auf den Kortex, rechts sagittale Ansicht) die Aufnahme von YFP-markierten Thy1-positiven Neuronen mittels TPLSM. Maßstabsleiste = 50 µm..... - 57 -
- Abbildung 23:** Darstellung von Astrozyten *in vivo* an Tag 3 nach ischämischem Schlaganfall mittels TPLSM durch die intrakortikale Applikation von SR101. Maßstabsleiste = 50 µm..... - 58 -
- Abbildung 24:** Darstellung von Astrozyten (Rot, SR101) und Blutgefäßen (Grün, FITC-Dextran) mittels *in vivo* TPLSM an Tag 3 nach ischämischem Schlaganfall. Maßstabsleiste = 50 µm..... - 58 -
- Abbildung 25:** : Darstellung von Astrozyten (Rot, SR101) und Neuronen (Gelb, YFP) mittels *in vivo* TPLSM. Maßstabsleiste = 50 µm. .... - 59 -
- Abbildung 26:** Darstellung von Blutgefäßen mit den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen mittels TPLSM. Von links nach rechts: FITC-Dextran (Grün), TRITC-Dextran (Rot) und Cascade Blue (Blau). Maßstabsleiste = 50 µm. .... - 60 -
- Abbildung 27:** Darstellung von Blutgefäßen mit FITC-Dextran mittels IVM an Tag 7 nach Operation des CCW. Maßstabsleiste = 0.06 mm. .... - 60 -

- Abbildung 28:** Aufnahmen von Blutgefäßen (FITC) aus dem Quadrant 2 im Verlauf (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) bei der ShamOP (links) und nach dMCAo (rechts). Maßstabsleiste = 100 µm..... - 62 -
- Abbildung 29:** Vergleichende Darstellung zwischen ShamOP und dMCAo der mittels TPLSM gemessenen Gefäßdurchmesser als Häufigkeitsverteilung in Histogrammen. Von oben nach unten sind die drei Aufnahmezeitpunkte (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) dargestellt. Zu beachten sind die Skalierungen der X- und Y-Achsen, die zum Zweck der besseren Lesbarkeit sich nicht entsprechen. .. - 65 -
- Abbildung 30:** Darstellung der statistischen Analyse des Unterschied zwischen den ermittelten Gefäßdurchmessern bei ShamOP und dMCAO mittels unpaarigem T-Test. Von oben nach unten sind die drei Aufnahmezeitpunkte (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) dargestellt. .... - 66 -
- Abbildung 31:** Vergleich der Gefäße (FITC) an den verschiedenen Aufnahmezeitpunkte (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) mittels TPLSM im Vergleich zwischen ShamOP (links) und dMCAo (rechts). Alle Aufnahmen stammen jeweils aus Quadrant 2. Maßstabsleiste = 50 µm..... - 67 -
- Abbildung 32:** Vergleichende Darstellung der im Infarktkern und Peri-Infarktzone nach dMCAo der mittels TPLSM gemessenen Gefäßdurchmesser als Häufigkeitsverteilung in Histogrammen. Von oben nach unten sind die drei Aufnahmezeitpunkte (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) dargestellt. .... - 69 -
- Abbildung 33:** Darstellung der statistischen Analyse des Unterschied zwischen den ermittelten Gefäßdurchmessern im Infarktkern und Peri-Infarktzone nach dMCAo mittels unpaarigem T-Test. Von oben nach unten sind die drei Aufnahmezeitpunkte (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) dargestellt. .... - 70 -
- Abbildung 34:** Statistische Analyse mittels unpaarigem T-Test der Gefäßdichte zu den jeweiligen Messzeitpunkten (Tag 3, Tag 7 und Tag 28 im Vergleich zwischen ShamOP und dMCAo. .... - 72 -
- Abbildung 35:** Statistische Analyse mittels unpaarigem T-Test der Gefäßdichte zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) und der Vergleich zwischen Infarktkern und Peri-Infarktzone..... - 74 -
- Abbildung 36:** Aufnahmen mittels TPLSM von Astrozyten (SR101, rot) und der Dura mater (SHG, blau). Links aus der Draufsicht (Maßstableiste = 50 µm) und rechts in der sagittalen Ansicht (Maßstableiste = 80 µm). Es eine diskrete Gruppierung von SR101-positiven Zellen oberhalb der Dura mater zu erkennen. .... - 80 -
- Abbildung 37:** Fluoreszenzmuster der unbekanntes Zellpopulation nach intrakortikaler Applikation von SR101 in Aufnahmen mittels TPLSM. Sie konnte sowohl im PMT 525 (links, Grün), als auch im PMT 593 (rechts, rot) detektiert werden. Bei der Darstellung beider Kanäle erscheinen die Zellen Gelb (mittig). Der Aufnahmezeitpunkt ist Tag 7 nach dMCAo. An Tag 3 wurde einmalig intrakortikal SR101 injiziert. Maßstabsleiste = 100 µm..... - 81 -

### 3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl Mikroliter

µm Mikrometer

BBB *engl.* blood brain barrier

CCW *engl.* chronic cranial window

cm Zentimeter

dMCAo *engl.* distal middle cerebral artery occlusion

eGFP *engl.* enhanced green fluorescent protein

FITC Fluorescein-Isothiocyanat

GFAP *engl.* glial fibrillary acidic protein

IVM Intravital-Epifluoreszenz-Videomikroskopie

MCA *engl.* middle cerebral artery

mg Milligramm

ml Milliliter

mm Millimeter

Mw *engl.* molecular weight

NaCl Natriumchlorid

nm Nanometer

NVU *engl.* neurovascular unit

OPO optisch parametrischer Oszillator

PTM *engl.* photomultiplier tube

rt-PA *engl.* recombinant tissue plasminogen activator

ShamOP *engl.* sham surgery

SHG *engl.* second harmonic generation

SR101 Sulforhodamin 101

Ti:Sa Titan:Saphir

TPLSM *engl.* two-photon laser scanning fluorescence microscopy / microscope

TRITC Tetramethylrhodaminisothiocyanat

YFP *engl.* yellow fluorescent protein

## 4 ZUSAMMENFASSUNG IN DEUTSCHER SPRACHE

Ein ischämischer Schlaganfall wird durch den akuten Verschluss eines relevanten Hirngefäßes verursacht und bewirkt eine Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung in dem betroffenen Hirnareal. Folglich beginnt eine Kaskade von pathologischen Prozessen, die das Absterben von Zellen und damit den Funktionsverlust dieser Hirnregion zur Folge haben kann. Bei der Patientin oder dem Patienten kann dies irreversible körperliche oder geistige Behinderungen und sogar den Tod verursachen. Das Ziel aktueller Forschung ist es, die pathophysiologischen Prozesse nach ischämischem Schlaganfall detaillierter zu verstehen und mögliche Therapien zu entwickeln.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Detektion und Analyse der Veränderungen der neurovaskulären Einheit nach ischämischem Schlaganfall. Der Begriff *neurovaskuläre Einheit* beschreibt die komplexe Interaktion aus Endothelzellen, Neurone, Astrozyten, Myozyten, Perizyten und Komponenten der extrazellulären Matrix, die den Austausch von Substanzen zwischen Blutgefäßsystem und Hirnparenchym reguliert.

Zur Untersuchung der Folgen des ischämischen Schlaganfalls in Bezug auf die neurovaskuläre Einheit stellte die Untersuchung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie von *post mortem* immunhistochemisch fluoreszenzmarkierten Hirnschnitten den bisherigen Goldstandard dar. Die *in vivo* Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine multidimensionale, longitudinale Analyse der neurovaskulären Einheit und stellt u.a. aufgrund der höheren Eindringtiefe einen erheblichen methodischen Fortschritt dar. Für die Induktion des ischämischen Schlaganfalls verwendeten wir das Mausmodell der distalen Okklusion der Arteria cerebri media mittels Elektrokoagulation. Weiterhin wurde ein chronisch kraniales Fenster implantiert, welches die *in vivo* Untersuchungen an Tag 3, 7 und 28 nach distaler Okklusion der Arteria cerebri media ermöglichte.

Mittels statistischer Analyse wurden die Parameter *Gefäßdurchmesser* und *Gefäßdichte* nach distaler Okklusion der Arteria cerebri media mit einer Kontrollgruppe verglichen. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Gefäßdurchmessers an Tag 3 nach der Intervention im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem deutete sich eine erhöhte

Neubildung von Blutgefäßen an Tag 7 nach distaler Okklusion der Arteria cerebri media aufgrund der im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhten Gefäßdichte an. An Tag 28 nach der Intervention wurde ein weitgehend rehabilitiertes Gefäßsystem beobachtet. Kein signifikanter Unterschied konnte hinsichtlich der genannten Parameter zwischen Infarktkern und Peri-Infarktzone detektiert werden.

Die *in vivo* Untersuchung mittels Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie stellt eine hervorragende Möglichkeit dar, die neurovaskuläre Einheit nach ischämischem Schlaganfall am Mausmodell zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit stellt die Methodik und die Ergebnisse dieser Untersuchungen vor und diskutiert Grenzen und Verbesserungsmöglichkeiten.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG IN ENGLISCHER SPRACHE

An ischemic stroke is caused by the acute occlusion of a relevant, brain-supplying vessel and causes an oxygen and nutrient shortage in the affected brain area. As a result, a cascade of pathological processes is initiated, which leads to cell death and loss of function in the affected area of the brain. This can cause irreversible physical or mental disabilities and even the patient's death. The aim of today's research is to understand the pathophysiological processes after ischemic stroke in more detail and, if possible, to intervene medically in order to improve the patient's treatment outcome.

Current studies focus on the characterization and the analysis of the damage inflicted on the neurovascular unit after ischemic stroke. The term *neurovascular unit* describes the complex interaction of endothelial cells, neurons, astrocytes, myocytes, pericytes and components of the extracellular matrix that regulate the exchange of substances between the blood vessel system and the brain parenchyma.

Examination by means of confocal laser scanning microscopy of *post mortem* immunohistochemically fluorescence-labeled brain slices has been the gold standard to investigate the consequences of ischemic stroke inflicted on the neurovascular unit. *In vivo* two-photon laser scanning fluorescence microscopy enables a multidimensional, longitudinal analysis of the neurovascular unit and represents a significant methodological progress due to the greater penetration depth, amongst other things. To induce the ischemic stroke, we used the mouse model of the distal middle cerebral artery occlusion using electrocoagulation. Furthermore, a chronic cranial window was implanted, which enabled *in vivo* investigations on days 3, 7 and 28 after distal middle cerebral artery occlusion.

Using statistical analysis, the parameters *vessel diameter* and *vessel density* after distal middle cerebral artery occlusion were compared with a control group. There was a significant increase in the vessel diameter on day 3 after the intervention compared to the control group. In addition, there was an increased formation of new blood vessels on day 7 after distal middle cerebral artery occlusion due to the trend towards increased vessel density. A largely rehabilitated vascular system could be observed on day 28 after the intervention. No significant difference could be detected between the ischemic core and the peri-infarct zone with regard to the parameters mentioned.

The *in vivo* investigation using two-photon laser scanning fluorescence microscopy is an excellent method to study the neurovascular unit after ischemic stroke in a mouse model *in vivo*. This thesis presents the methodology and the results of these investigations and also discusses limitations and possibilities for improvement.

## 6 EINLEITUNG

### 6.1 Ischämischer Schlaganfall

#### 6.1.1 Definition und Inzidenz

Weltweit gilt der Schlaganfall als die zweithäufigste Todesursache und stellt die Hauptursache für eine bleibende psychische oder physische Behinderung dar (Donnan et al., 2008). Definiert wird der Schlaganfall durch den akuten neuronalen Funktionsverlust in einem relevanten Teilgebiet des Gehirns, der Retina oder des Rückenmarks (Hankey, 2017). Im Jahr 2016 lag in Deutschland das Risiko ab einem Alter von 25 Jahren einen Schlaganfall zu erleiden zwischen 23,0 und 28,9% (Collaborators et al., 2018). Auch im Falle eines nicht tödlichen Verlaufs leiden Patientinnen und Patienten häufig an den Folgen der Erkrankung. Eine Analyse der „Global Burden of Disease Study“ aus dem Jahr 2017 bezifferte die Jahre, die Menschen weltweit beeinträchtigt durch die Folgen eines ischämischen Schlaganfalls leben, für das Erscheinungsjahr der Studie auf 18 695 400 – der höchste Wert in der Kategorie „Kardiovaskuläre Erkrankungen“ (Collaborators, 2017).

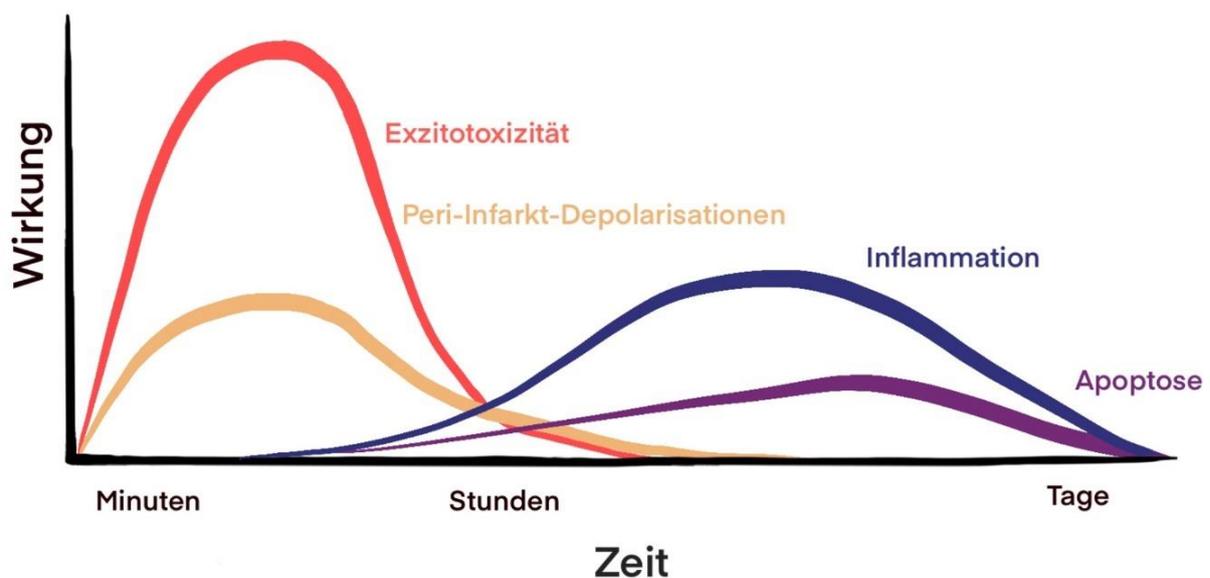
Man unterscheidet zwei Arten des Schlaganfalls: Häufiger tritt der *ischämische* Schlaganfall auf, bei dem ein akuter Gefäßverschluss der Grund für eine Minderversorgung des betroffenen Areals mit Sauerstoff und Nährstoffen ist. Seltener kommt es zu einem *hämorrhagischen* Schlaganfall. Hierbei löst eine Blutung eine relative Minderversorgung aus. Während das Lebenszeitrisiko weltweit für einen hämorrhagischen Schlaganfall ab einem Alter von 25 Jahren mit 8,2% bemessen wurde, lag es bei einem ischämischen Schlaganfall bei 18,3% (Zhao and Huang, 2019). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung des ischämischen Schlaganfalls.

#### 6.1.2 Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls

Der Schädigungsmechanismus eines ischämischen Schlaganfalls beruht nicht nur auf dem akuten Verschluss einer relevanten Arterie des Gehirns und der damit einhergehenden Minderversorgung mit den überlebensnotwendigen Substanzen, die im

Blut enthalten sind. Vielmehr führt die Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung zu einer Kaskade an Reaktionen in dem betroffenen und umliegenden Gewebe.

Dirnagl et al. teilen die Schädigung des Gewebes durch einen ischämischen Schlaganfall in die Mechanismen *Exzitotoxizität*, *Peri-Infarkt-Depolarisation*, *Entzündung* und *Apoptose* ein. Die Unterbrechung der Zufuhr von Sauerstoff und Glukose bewirkt eine Depolarisation der Zelle. Exzitotoxizität bezeichnet den nun einsetzenden Prozess: Intrazellulär erhöhen sich die Konzentrationen von Calcium, Natrium und Chlorid, wohingegen Kalium und exzitatorische Neurotransmitter, insbesondere Glutamat, in den Extrazellularraum freigesetzt werden. Die fehlende präsynaptische Wiederaufnahme verstärkt den entstandenen Überschuss an exzitatorischen Neurotransmittern. Der Bereich, der weiterhin partiell durchblutet wird, wird als Peri-Infarktzone oder Penumbra (*dt.* Halbschatten) bezeichnet. Hierhin können sich die Depolarisationswellen aus dem Infarktkern, sog. Peri-Infarkt-Depolarisationen, ausbreiten. In den depolarisierten Zellen werden zahlreiche Enzymsysteme, wie z.B. Proteasen Lipasen und Endonukleasen, durch die erhöhte intrazelluläre Konzentration von Calcium aktiviert. Diese Enzymsysteme zerstören u.a. die Zellwand, wodurch freie Radikale gebildet werden, welche wiederum die Synthese von proinflammatorischen Genen anregen. Auch die Membran der Mitochondrien verliert ihre Stabilität – die Freisetzung von darin gespeichertem Cytochrom C führt zur Apoptose der Zelle (Dirnagl et al., 1999).



**Abbildung 1:** Mutmaßlicher Ablauf der Schädigungsmechanismen des ischämischen Schlaganfalls. Einzelndargestellt im Ausmaß ihrer Wirkung sind im zeitlichen Verlauf die Mechanismen Exzitotoxizität, Peri-Infarkt-Depolarisationen, Inflammation und Apoptose. Eigene Darstellung nach (Dirnagl et al., 1999).

Die Erhöhung der intrazellulären Natrium- sowie Chloridkonzentrationen und der damit einhergehende Wassereinstrom führen zudem zur Bildung eines sog. zytotoxischen Ödems im betroffenen Gewebe (Rosenberg, 1999).

### 6.1.3 Therapie des ischämischen Schlaganfalls

Eine der ersten vielversprechenden klinischen Experimente zur Verbesserung des Behandlungsergebnis nach einem ischämischen Schlaganfall, war im Jahr 1995 die Gabe des rekombinanten gewebspezifischem Plasminogenaktivator (rt-PA = *engl.* recombinant tissue plasminogen activator), einem Fibrinolytikum. Bei intravenöser Injektion innerhalb der ersten drei Stunden nach Beginn des ischämischen Schlaganfalls, ließ sich drei Monate später ein erhöhter Barthel-Index, ein Wert zur Beurteilung der Fähigkeit der Bewältigung alltäglicher Aufgaben, erkennen (National Institute of Neurological and Stroke rt, 1995). In diesem Zusammenhang wurde die Bevölkerung auch für die Frühzeichen und daraus resultierendem schnellen Handeln im Zusammenhang mit dieser Erkrankung sensibilisiert, z.B. durch die sog. „Brain Attack“-Kampagne der „American Heart Association“ (Lenzer, 2002).

In der Veröffentlichung der Leitlinien im Jahr 2021 durch die „Europäische Schlaganfall-Gesellschaft“ wird rt-PA als das am meisten verabreichte Fibrinolytikum nach ischämischen Schlaganfall betitelt (Berge et al., 2021). Die genannte Leitlinie empfiehlt die Anwendung von rt-PA unabhängig vom Alter innerhalb der ersten viereinhalb Stunden nach Symptombeginn. Als Ausnahmen für diese Anwendung gelten u.a. die Einnahme von direkten oralen Antikoagulantien, kürzlich erfolgte größere chirurgische Eingriffe oder das Vorliegen eines schweren Traumas, einer Endokarditis oder einer Aortendissektion (Berge et al., 2021).

Immer wieder allerdings kommt es zu Verstößen in der Gabe oder der Nicht-Gabe des Fibrinolytikums, hauptsächlich wegen des Risikos einer intrazerebralen Blutung (Weintraub, 2006).

Bei Patientinnen und Patienten mit dem Verschluss eines großen Gefäßes im vorderen Stromgebiet, genauer der Arteria carotis interna oder dem M1- oder M2-Segment der Arteria cerebri anterior, ist außerdem die endovaskuläre Entfernung des Blutgerinnsels in Erwägung zu ziehen (Mokin et al., 2019). Diese Intervention wird auch als *mechanische*

*Thrombektomie* bezeichnet. Sie ist, je nach Definition der Kriterien, in 3-22% der ischämischen Schlaganfälle möglich, wobei das Zeitfenster mit 16 Stunden - und in ausgewählten Fällen bis zu 24 Stunden - nach Symptombeginn deutlich größer ist (Mokin et al., 2019). Zu beachten ist, dass die mechanische Thrombektomie in Kombination mit der Gabe eines Fibrinolytikums der alleinigen Durchführung der mechanischen Thrombektomie überlegen ist (Turc et al., 2019).

Die Leitlinie der Amerikanischen Herzgesellschaft empfiehlt folgend auf die notfallmäßige Behandlung des ischämischen Schlaganfalls zudem die medizinische Rehabilitation, welche zum einen von großer klinischer Relevanz sei und zum anderen das Morbiditätsrisikos aufgrund von Immobilität, Depression, Autonomieverlust oder reduzierter Selbstständigkeit senken kann. Der stationäre Aufenthalt in einer Rehabilitationseinrichtung ist dabei dem Aufenthalt im Pflegeheim vorzuziehen. Die Dauer, Intensität sowie der genaue Ablauf des Aufenthalts ist der Art der körperlichen oder geistigen Beeinträchtigung anzupassen (Winstein et al., 2016).

## 6.2 Neurovaskuläre Einheit

### 6.2.1 Aufbau und Funktion

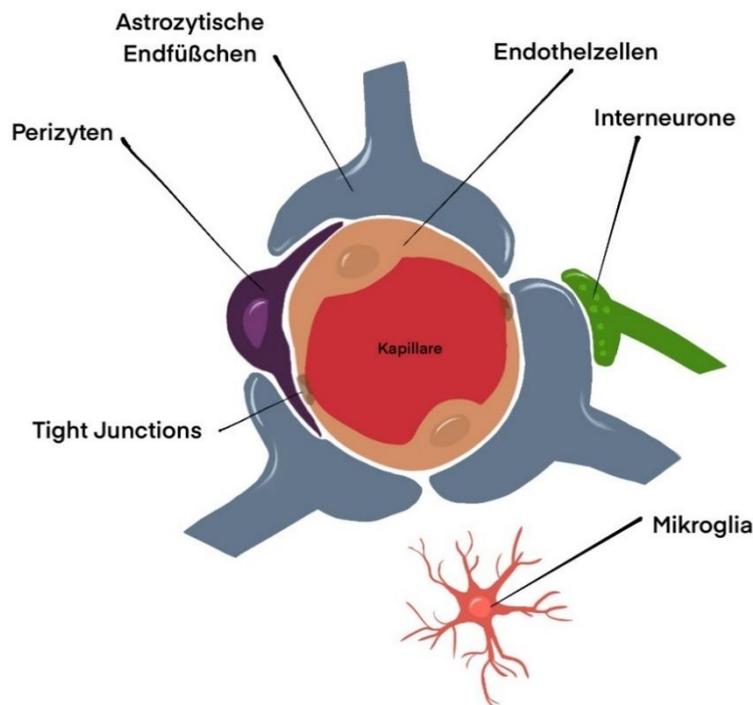
Eine optimale Versorgung und Funktion des Gehirns wird laut Andreone et al. durch drei Komponenten gewährleistet (Andreone et al., 2015):

- die intakte Struktur des Gefäßsystems, das Blut und Nährstoffe in das Hirnparenchym transportiert,
- die funktionelle Blut-Hirn-Schranke (BBB = *engl.* blood-brain barrier) zur Aufrechterhaltung der Homöostase
- und die Regulierung des zerebralen Blutflusses, angepasst an den Energiebedarf des entsprechenden Hirnareals.

Die BBB als Begrenzung des zerebralen Gefäßsystems besteht aus Endothelzellen und den Tight Junctions und hat zur Aufgabe, im Blut zirkulierende Plasmabestandteile, Erythrozyten oder Leukozyten nicht unkontrolliert in das Hirnparenchym bzw. den Liquor cerebrospinalis übergehen zu lassen (Zlokovic, 2008). Aufgabe der BBB ist es, die Neurone vor diesen Komponenten zu schützen, da eine Verletzung der BBB, und die

damit verbundene Störung der Homöostase, die synaptische Übertragung sowie die neuronale Funktionsweise erheblich beeinträchtigen kann (Zlokovic, 2008).

Zu der physikalischen Begrenzung zählen weitere Prozesse, die die Trennung von Blut und Zentralnervensystem und damit den Schutz der Neurone sicherstellen (Jiang et al., 2018). Um den morphologischen, aber auch funktionellen Zusammenhang zu betonen, werden all diese Komponenten als *neurovaskuläre Einheit* (NVU = *engl.* neurovascular unit) bezeichnet. Im Sinne einer Barriere trägt die Interaktion von mehreren Elementen zur Aufrechterhaltung der Homöostase sowie zur Abwehr von Entzündungsprozessen und Erkrankungen bei (Jiang et al., 2018). Zu den Elementen der NVU zählen neben den Endothelzellen auch Neurone, Astrozyten, Myozyten, Perizyten und Komponenten der extrazellulären Matrix (Muio et al., 2014). Teilweise werden zudem Mikroglia und Interneurone der NVU zugerechnet (Liebner et al., 2018).



**Abbildung 2:** Die Komponenten der NVU bilden eine funktionelle Einheit. Gezeichnet sind hier: Endothelzellen, Neurone, Astrozyten mit astrozytischen Endfüßchen, Neurone, Tight Junctions, Mikroglia und Interneurone. Eigene Darstellung nach (Abbott et al., 2006).

Bei einem ischämischen Schlaganfall verliert die NVU ihre Integrität, eine Veränderung, die u.a. zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäße führt (Jiang et al., 2018). Neben dem beschriebenen zytotoxischen Ödem, bildet sich zusätzlich ein vasogenes Ödem aus. Der

erhöhte Flüssigkeitsstrom steigert das Risiko einer sekundären Einblutung (Rosenberg, 1999). Zudem besteht die Gefahr, dass durch den extravasalen Flüssigkeitsaustritt intaktes Hirnparenchym komprimiert wird.

Laut Huang et al. stellt eine gestörte BBB auch eine Eintrittspforte für Leukozyten dar. Neutrophile Granulozyten adhären während der ischämischen Phase an das Endothel und wandern bei der Reperfusion vermehrt in das umliegende Gewebe ein, wo sie die Entzündungsreaktion verstärken (Huang et al., 2006).

Die Funktion der Peri-Infarktzone ist zwar vorerst beeinträchtigt, kann jedoch im Fall der Reperfusion wiederhergestellt werden. Bedingung hierfür ist, dass dieses Areal nicht, z.B. durch eine Entzündungsreaktion, weiter geschädigt wird. Folglich stellt die Aufrechterhaltung bzw. die Wiederherstellung der BBB – und weiter gefasst, der NVU – einen entscheidenden Ansatzpunkt dar, mit dem ischämischen Schlaganfall befassten Forschung dar (Freitas-Andrade et al., 2020).

### 6.2.2 Neurone

Allgemein unterscheidet im Nervensystem die Zellpopulation der *Neurone* und die der *Neuroglia*. Zuerst soll die Aufgabe Zellpopulation der Neurone beschrieben werden, im Anschluss die der Neuroglia.

Ein Neuron besteht aus einem Zellkörper, dem *Soma*, zahlreichen *Dendriten*, welche Signale anderen Zellen empfangen können, und dem *Axon*, welches Signale an andere Zellen weiterleitet. Innerhalb eines Neurons werden Informationen über elektrische Signale weitergeleitet, wohingegen die Kommunikation zwischen zwei Neuronen oder einem Neuron und einer anderen Zelle mithilfe von chemischen Signalmolekülen, *Neurotransmittern*, stattfindet (Lovinger, 2008). Die Übertragungsstelle zwischen zwei Neuronen oder einem Neuron und einer anderen Zelle wird als *Synapse* bezeichnet. Eine Synapse kann spezifischer in zwei Komponenten eingeteilt werden: in die *Präsynapse* der signalübertragenden Zelle und in die *Postsynapse* der Zielzelle.

Donald Olding Hebb postulierte in seinem 1949 veröffentlichten Werk „The Organization of Behaviour: A Neuropsychological Theory“ die heute als *Hebbsche Lernregel* bekannte These: Das häufige Erregen einer Nervenzelle A bewirkt, dass sich morphologische oder metabolische Verbindungen zu einer benachbarten Nervenzelle B, welche simultan

erregt wird, ausbilden und somit die simultane Erregung in der Zukunft wahrscheinlicher wird. Der Originaltext lautet: "When an axon of cell A is near enough to excite cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased." (Hebb, 1949). Hebb legte somit den Grundstein für das Konzept der *synaptischen Plastizität*, die Tatsache, dass sich es sich bei Synapsen um formbare Verbindungen handelt, welche eine entscheidende Bedeutung u.a. bei assoziativen Lernprozessen und der Bildung des deklarativen Gedächtnisses einnehmen (Whitcomb et al., 2011).

Die Postsynapsen sind im zentralen Nervensystem zu einem Großteil auf knollenförmigen Ausstülpungen der Dendriten zu finden, auf sog. *dendritischen Spines* (Hlushchenko et al., 2016).

Trachtenberg et al. beobachteten am Mausmodell mittels Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie (TPLSM = *engl.* two-photon laser scanning microscopy / microscope) und Rasterelektronenmikroskopie dendritische Spines an Pyramidenzellen der Schicht V des Kortex und stellten folgenden Zusammenhang fest: Das Aussprossen dendritischer Spines war mit dem Ausbilden einer Synapse verbunden, das Zurückziehen eines dendritischen Spines mit dem Auflösen einer Synapse (Trachtenberg et al., 2002).

Bei einem ischämischen Schlaganfall kommt es infolge der in 6.1.2 beschriebenen pathophysiologischen Prozesse zum Untergang von Nervenzellen. Bei einem typischen Verschluss eines großen Hirngefäßes sind es pro Stunde ca. 120 Millionen Neurone, eine Veränderung, die – verglichen mit dem gewöhnlichen Untergang von Neuronen – einer Alterung des Gehirns um 3,6 Jahre entspricht (Saver, 2006). Während die Apoptose in dem Infarktkern in den Minuten nach dem ischämischen Schlaganfall beginnt, setzt sie in der Peri-Infarktzone erst nach Stunden bis Tagen ein (Radak et al., 2017).

In der Peri-Infarktzone beobachteten Ito et al. bis Tag 4 nach ischämischem Schlaganfall eine Abnahme der Anzahl von Synapsen, synaptischen Vesikeln und dendritischen Spines und eine Abnahme des prozentualen Volumens von Axonterminalen und dendritischen Spines. Nach 1-12 Wochen erhöhten sich diese Werte jedoch wieder, sogar bis über das Niveau einer Kontrollgruppe hinaus (Ito et al., 2006).

### 6.2.3 Astrozyten

Die Neuroglia wurden erstmals im Jahr 1871 durch Rudolph Virchow in seinen „Vorlesungen über Pathologie“ so benannt. Neuroglia wurden damals noch als „Nervenkitt“ bezeichnet und dem Bindegewebe zugerechnet, „über die Art der Zusammensetzung und über die Ausdehnung“ war man sich jedoch noch uneinig (Virchow, 1871).

Im Jahr 1895 bezeichnete Michael v. Lenhossék die Neuroglia mit dem Begriff „Astrocyten“. Er sprach sich gegen die damals vorherrschende Meinung aus, dass es sich um ein Stützgewebe handle, um eine „mörtelartige Zwischenmasse“, sondern plädiert viel eher für die Auffassung als ein Geflecht von Zellen einer „besonderen Zellgattung“. Als Bezeichnung schlägt er den Begriff „Spinnenzellen“ oder „Astrocyten“ vor (Lenhossék, 1895).

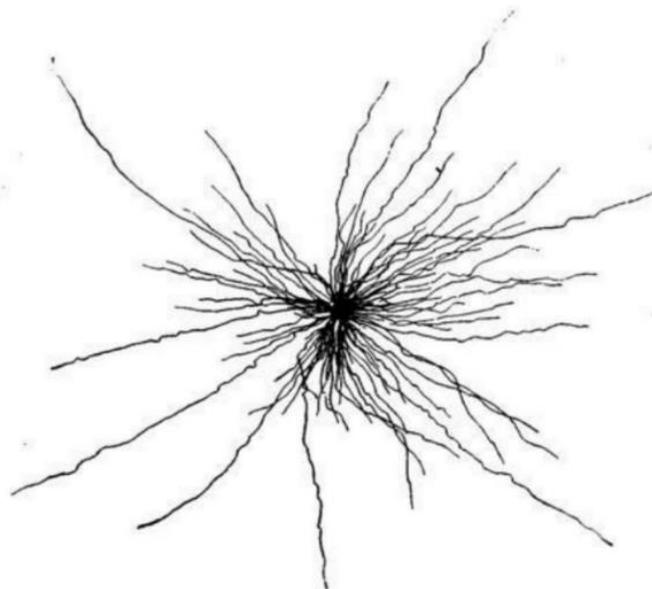


Fig. 20.

Spinnenzelle aus dem Rückenmarke eines  $\frac{3}{4}$ jährigen Kindes.

**Abbildung 3:** Eine der ersten Zeichnungen einer sog. „Spinnenzelle“, heute genannt „Astrozyt“, in einem Werk aus dem Jahr 1895 (Lenhossék, 1895).

Die noch heute gültige Differenzierung der Neuroglia in die drei Zellarten Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen ist im Jahr 1919 durch den Spanier Pío del Río-Hortega, einem ehemaligen Schüler von Santiago Ramon y Cajal, vorgenommen worden (Sierra et al., 2016). Del Río-Hortega unterschied zudem *proteoplastische* Astrozyten,

welche in der grauen Substanz lokalisiert seien, von *fibrillären* Astrozyten, welche ausschließlich in der weißen Substanz zu finden seien (Sierra et al., 2016).

Laut B. Liu et al. ist diese Einteilung ist noch heute gültig und wurde mittlerweile weiter ausgeführt: Die proteoplasmatische Astrozyten sind näher an den Neuronen lokalisiert und besitzen neben einer höheren Anzahl an Zellorganellen auch dickere, kürzere und stärker verzweigte Fortsätze, welche teilweise zu den neuronalen Synapsen oder den Blutgefäßen führen. Die fibrillären Astrozyten hingegen besitzen weniger, aber dafür längere Fortsätze, welche axonalen Bahnen als mechanischen sowie metabolische Unterstützung dienen (Liu et al., 2017).

Mit der Entwicklung von neuen Untersuchungsmethoden konnten Astrozyten im Verlauf zusätzlich anhand einzelner Proteinstrukturen unterschieden werden. Das saure Gliafaserprotein (GFAP = *engl.* glial fibrillary acidic protein) wurde als Bestandteil des astrozytären Zytoskeletts, genauer als dominierendes Intermediärfilament, identifiziert und seitdem in zahlreichen Studien als ein Identifikationsmerkmal von Astrozyten verwendet (Middeldorp and Hol, 2011).

In Bezug auf die NVU sind Astrozyten morphologisch zwischen Blutgefäßen und Neuronen lokalisiert (Liu et al., 2020). Unter physiologischen Bedingungen stärken Astrozyten die Funktion der BBB, indem sie mit ihren sog. Endfüßchen (*engl.* end-feet) abluminal die Blutgefäße nahezu vollständig umschließen und das Protein *sonic hedgehog* sekretieren, welches die Tight Junctions der BBB reguliert (Obermeier et al., 2013).

Nach B. Liu sind Astrozyten auch an der Bildung von neuronalen Synapsen durch die Kontrolle des Kalium- und des Neurotransmitter-Levels im Extrazellularraum und somit des pH-Werts beteiligt. Weiterhin stellen sie Neuronen über den Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle Energie in Form von Pyruvat bereit, können Neurone vor reaktiven Sauerstoffspezies schützen und regulieren zudem den zerebralen Blutfluss (Liu et al., 2017).

In pathophysiologischen Prozessen ist die Funktion der Astrozyten vielfältig. Bei einem ischämischen Schlaganfall nehmen Astrozyten z.B. den zu zahlreich ausgeschütteten Neurotransmitter Glutamat auf und schützen damit Neurone zumindest teilweise vor der Exzitotoxizität (Swanson et al., 2004). Als reaktive Astroglie (*engl.* reactive astrogliosis) wird das Phänomen bezeichnet, dass Astrozyten, welche auf veränderte, pathologische

Bedingungen reagieren, ihre morphologischen und funktionellen Eigenschaften verändern (Xu et al., 2020).

So bilden z.B. reaktive Astrozyten nach ischämischem Schlaganfall in der Peri-Infarktzone eine Abgrenzung zu dem gesunden Gewebe – ein Prozess der als gliale Narbe (*engl.* glial scar) bezeichnet wird und die Aufrechterhaltung der Homöostase außerhalb des geschädigten Bereichs zum Ziel hat. Die gliale Narbe wird v.a. durch die Hypertrophie der Astrozyten und eine vermehrte Expression von GFAP erreicht (Xu et al., 2020).

Laut Sims und Yew lassen sich die Prozesse nach ischämischem Schlaganfall in der Peri-Infarktzone zeitlich folgendermaßen charakterisieren: Bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Ischämie sind erhöhte mRNA Level für das Protein GFAP nachweisbar. Die gesteigerte Expression von GFAP beginnt innerhalb von wenigen Tagen und erreicht das Maximum in der Zeit zwischen ein und zwei Wochen (Sims and Yew, 2017).

Es sind jedoch auch für die Heilung nachteilige Reaktionen von Astrozyten nach ischämischen Schlaganfall bekannt. Die beschriebene Aktivierung von Astrozyten führt auch zu einer Erhöhung der Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt und somit wiederum zu einer Verstärkung der Exzitotoxizität (Abeyasinghe et al., 2016). Der Umbau hin zur reaktiven Astroglie geht außerdem einher mit einem Zurückziehen der Fortsätze der Astrozyten von Blutgefäßen und Neuronen und darauffolgendem Lösen der ansonsten dichten Tight Junctions (Abeyasinghe et al., 2016).

Zusammenfassend lässt sich über das Verhalten von Astrozyten nach ischämischem Schlaganfall nicht eine eindeutig positive oder negative Rolle definieren, sondern vielmehr eine Vielzahl von modulierenden Reaktionen beschreiben (Abeyasinghe et al., 2016). Umso interessanter sind die umfassenden *in vivo* Untersuchungen der Astrozyten bzw. der NVU nach ischämischem Schlaganfall mittels TPLSM.

#### 6.2.4 Blutgefäße

Außerdem sollen das Blutgefäßsystem und Veränderungen von ebendiesem betrachtet werden. Wie bereits erläutert, ist die Integrität des Blutgefäßes essentiell, um das Hirnparenchym mit Sauerstoff und den benötigten Nährstoffen zu versorgen.

Nach Cipolla existieren zum einen *piale* Arterien, welche sich intrakranial auf der Kortexoberfläche befinden und wiederum kleinere Arterien in das Kortexinnere abgeben. Diese werden im Verlauf zu *parenchymalen Arteriolen* und an dieser Stelle fast vollständig von astrozytären Endfüßchen umschlossen. Diese Unterscheidung ist wichtig, da *piale* Arterien perivaskulär sog. extrinsische Innervation aus dem peripheren Nervensystem erhalten, wohingegen die *parenchymalen Arteriolen* intrinsisch durch das Neuropil, d.h. durch das Zentralnervensystem, innerviert werden. *Piale* Gefäße sind zudem zu einem Netzwerk verbunden, in dem eine Okklusion einen geringeren Schaden verursacht als der Verschluss einer deutlich weniger verzweigten *parenchymalen Arteriole* (Cipolla, 2009).

Das Ziel der Untersuchung mittels TPLSM waren die *parenchymalen Arteriolen*. Sowohl die oberflächlichen, in der *Pia mater* gelegenen, als auch die tieferen, zentralen Venen sowie der *Sinus durae matris* waren für unsere Beobachtungen nicht von primärem Interesse.

Im Hinblick auf die Neubildung von Blutgefäßen gilt es, zwei Mechanismen voneinander abzugrenzen:

Nach Patan bezeichnet die Vaskulogenese die *in situ* Differenzierung und das Wachstum von Blutgefäßen aus mesenchymal abstammenden Hämangioblasten, den gemeinsamen Vorläuferzellen von Endothel- und Blutzellen. Der Begriff beschreibt somit vor allem das Gefäßwachstum während der Embryonalentwicklung (Patan, 2004).

Mechanismen der Vaskulogenese konnten allerdings auch bei der Neovaskulisation von ischämischem Gewebe durch das Vorhandensein von endothelialen Vorläuferzellen belegt werden (Murasawa and Asahara, 2005).

Die *Angiogenese* umfasst hingegen zwei verschiedene Mechanismen: zum einen das Aussprossen von Endothelzellen (*engl.* endothelial sprouting) und zum anderen das intussuszeptive mikrovaskuläre Wachstum, d.h. die septale Spaltung von bereits

vorhandenen Blutgefäßen (Patan, 2004). Als wichtigstes Mitogen der Angiogenese wird der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor bezeichnet (Beck and Plate, 2009).

Nach einem ischämischen Schlaganfall kann die Angiogenese als natürlicher Schutzmechanismus gewertet werden, um betroffenen Hirnareale wieder mit Sauerstoff sowie Nährstoffen zu versorgen (Beck and Plate, 2009). Die Angiogenese wird vor allem in den Randbereichen des Infarkts, d.h. im Peri-Infarktzone, beobachtet. Erste proliferierenden Endothelzellen wurde in Tierexperimenten nach einem Verschluss der MCA bereits 12-24 Stunden nach der Intervention detektiert. Untersuchungen von Hayashi et al. am Mausmodell konnten zwar auch bereits einen Tag nach distaler Okklusion der Arteria cerebri media (dMCAo = *engl.* distal middle cerebral artery occlusion) eine Proliferation von Endothelzellen beobachten, eine signifikante Zunahme der Anzahl an Gefäßen jedoch auch erst an Tag 3 nach der Intervention (Hayashi et al., 2003).

Schon früh konnte gezeigt werden, dass eine höhere Gefäßneubildung die Überlebenschancen der Patientinnen und Patienten nach ischämischen Schlaganfall erhöht (Krupinski et al., 1994). Es wird zudem vermutet, dass sich die Angiogenese über verschiedene Mechanismen positiv auf die funktionelle Rehabilitation, d.h. auf die Neurogenese, auswirkt (Hatakeyama et al., 2020).

### 6.3 ***In vivo* Mikroskopie des Gehirns am Mausmodell**

#### 6.3.1 Vorteile der *in vivo* Untersuchung

Um die oben beschriebenen Fragestellungen in Bezug auf zelluläre Regenerationsprozesse nach ischämischen Schlaganfall zu beantworten, stellen aktuell *post mortem* immunhistologische Färbungen mit anschließender Untersuchung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie (CLSM = *engl.* confocal laser scanning microscopy) den Goldstandard dar. Der Ablauf kann z.B. so aussehen, dass 3 Tiere mit einem ischämischen Schlaganfall operiert werden und nachfolgend jeweils an den Tagen 3, 7 und 28 nach Schlaganfall das Tier getötet und das Gehirn für die Mikroskopie mittels CLSM entnommen wird.

Einen deutlichen Fortschritt stellt die Anwendung der *in vivo* Mikroskopie dar. Die Anzahl der benötigten Versuchstiere reduziert sich erheblich, da ein Versuchstier zu mehreren

Zeitpunkten untersucht werden kann. Zudem lassen sich Unsicherheiten durch z.T. hohe interindividuelle Varianzen eliminieren, da der Vergleich der Untersuchungsergebnisse zwischen ein und demselben Tier stattfindet. Auch können durch die *in vivo* Mikroskopie komplexe, dynamische Zellinteraktionen am lebenden Organismus untersucht werden, wodurch der Informationsgehalt der Messungen deutlich erhöht wird.

### 6.3.2 Wie mikroskopiert man das Gehirn *in vivo*?

Bevor die TPLSM in der Forschung Einzug gehalten hat, wurden bereits *in vivo* Aufnahmen mittels IVM generiert. Den Grundstein der IVM legte im Jahr 1964 R. T. Grant an der Guy's Hospital Medical School in London, wobei er den Musculus cremaster einer Ratte als erstes geeignetes Untersuchungsobjekt für den Einsatz der IVM auswählte (Grant, 1964). Das Modell zur Untersuchung der Morphologie und Physiologie des Musculus cremaster am Tiermodell wurde am Albert Einstein College of Medicine in New York von S. Baez weiterentwickelt (Baez, 1973). Dieser Muskel galt als Untersuchungsmodell besonders geeignet, da der Zugangsweg einfach und der gesamte Muskel, der an diesem Tiermodell lediglich 2-4 Muskelschichten dick ist, leicht zu durchleuchten war (Hartsock et al., 1989). Einige Jahre später wurde die IVM als nicht-invasive Methode für Untersuchungen am Menschen von z.B. Lymphkapillaren der Haut (Franzeck U.K., 1994) oder Blutkapillaren des Nagelfalzes (Bollinger et al., 1982) verwendet.

Auch wenn die Idee der TPLSM sich auf dem gleichen Zeitraum datieren lässt, wurde diese erst einige Jahre später praktisch angewendet. Im Jahr 1963 wurde der Nobelpreis für Physik an die deutsch-amerikanische Forscherin Maria Goeppert-Mayer (1906-1972) verliehen, für ihre Ausführung zur Kernschalenstruktur, welche die theoretische Grundlage für die heute umgesetzte TPLSM bildet (Grzybowski and Pietrzak, 2013). Weiterentwickelt wurde die Methode maßgeblich von dem späteren Nobelpreisträger Robert Tsien (Tsien et al., 1985) und von Winfried Denk, der im Jahr 1990 die Vorteile der TPLSM gegenüber der CLSM beschrieb (Denk et al., 1990). Innerhalb kurzer Zeit folgten die ersten tierexperimentellen *in vivo* Messungen mittels TPLSM, u.a. des Gehirns, der Haut und der Niere (Dunn et al., 2002). Zunächst vermutete man, dass die *in vivo* Untersuchungen auf die Gewebearten Haut und Gehirn beschränkt seien, da einzig diese

für die Mikroskopie erreichbar seien, ohne das Gewebe zu beschädigen (Osswald and Winkler, 2013). Doch mittlerweile wurden ebenfalls Methoden für die *in vivo* TPLSM des Rückenmarks (Farrar et al., 2012) oder Knochenmarks (Stefanowski et al., 2020, Reismann et al., 2017) vorgestellt.

Bei der Planung von *in vivo* Untersuchungen muss immer ein Weg gefunden werden, damit das zu untersuchende Gewebe, für die Mikroskopie optisch zugänglich wird. Für die Untersuchungen am Gehirn ist das Mittel der Wahl oftmals ein chronisch kraniales Fenster (CCW = *engl.* chronic cranial window, CCW), welches in verschiedenen Modalitäten ausgeführt werden kann. Zum einen kann die Kalotte über dem zu untersuchenden Bereich des Kortex mit einem Bohrer so weit ausgedünnt werden, dass die Distanz zu dem Kortex klein genug für die Mikroskopie des zu untersuchenden Gewebes wird. Zum anderen ist es möglich, eine Kraniotomie direkt über dem zu untersuchenden Kortexareal durchzuführen und anschließend diesen Bereich des Knochens mit einem Deckglas zu verschließen. In den unseren Experimenten wandten wir die letztgenannte Variante an.

#### 6.4 Ziel der Arbeit

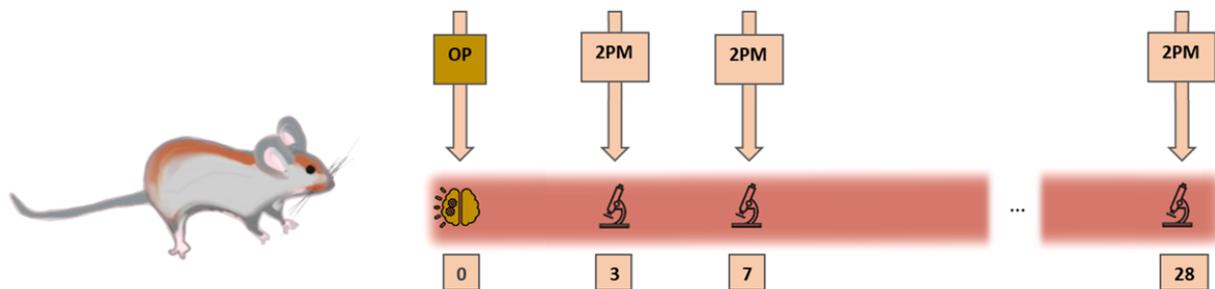
Um bleibende Schäden des ischämischen Schlaganfalls, in Form von körperlichen und geistigen Beeinträchtigungen zu minimieren, werden neue therapeutische Ansätze benötigt. Sie sollen die Neurone und Gliazellen des Gehirns schützen bzw. die Regeneration des von der Ischämie betroffenen Gewebes anregen. Dazu ist es nötig die räumliche und zeitliche Kaskade der pathophysiologischen Prozesse der NVU auf zellulärer Ebene zu verstehen. Der bisherige Goldstandard ist die Untersuchung von *post mortem* immunhistologisch gefärbten Hirnschnitten mittels CLSM. Mithilfe dieser Methode können jedoch Veränderungen der NVU aufgrund der geringen optischen Eindringtiefe nur bedingt räumlich dargestellt werden. Vor allem aber fehlen Erkenntnisse über die Interaktionen der verschiedenen Komponenten sowie die kontinuierliche Untersuchung desselben Versuchstiers. Zur longitudinalen *in vivo* Untersuchung der NVU nach ischämischem Schlaganfall stellen wir in der vorliegenden Arbeit die Anwendung der TPLSM als geeignete Methode vor.

## 7 MATERIAL UND METHODEN

### 7.1 Studiendesign

Der experimentelle Aufbau erstreckte sich über einen Zeitraum von 28 Tagen. An Tag 0 erfolgte die Operation des Schlaganfalls bzw. der Scheinoperation (ShamOP = *engl.* sham surgery, *hier genannt:* ShamOP) sowie des CCW. 24-72 Stunden nach der Operation des Schlaganfalls führten wir zur Verifizierung des stattgefundenen Schlaganfalls eine Magnetresonanztomographie-Bildgebung des Schädels in T2-Wichtung durch. Es wurden nur die Tiere in die Untersuchungsgruppe „Schlaganfall“ eingeschlossen, welche in der Magnetresonanztomographie einen bis unter das CCW reichenden Infarktbereich zeigten.

Für die Analyse der Komponenten der NVU mittels TPLSM wurden die Zeitpunkte 3, 7 und 28 Tage nach der Operation gewählt (vgl. Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Graphisch dargestellt ist der Versuchsaufbau, der für die systematische Datenerfassung gewählt wurde. Tag 0: OP, Tag 3, 7 und 28: Messung mittels TPLSM.

Für die Methodenetablierung des CCW wurden außerdem Messungen an Tag 1 und 14 nach der Operation durchgeführt.

Die Versuche beruhen auf dem durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigten Tierversuchsantrag mit der Genehmigungsnummer G0220/17. Alle Versuche wurden stets mit außerordentlicher Sorgfalt und gemäß der Tierschutz-Versuchstierverordnung durchgeführt.

## 7.2 Versuchstiere: EphrinB2 lox x Thy1-YFP-CreERT2

In unserer Arbeitsgruppe wurde in der Vergangenheit und wird aktuell weiterhin an dem Signalsystem der Ephrine geforscht. Unsere Arbeit stellt eine neue Methode vor, die Rolle dieser Signalmoleküle nach ischämischem Schlaganfall in Zukunft besser zu untersuchen. Der Hintergrund soll an dieser Stelle jedoch erläutert werden, um die Genetik der verwendeten Mauslinie zu verstehen.

Nach Ghori et al. tragen das Glykoprotein ephrinB2 und sein Rezeptor EphB4 eine der Hauptrollen im vaskulären Umbau und lassen sich in verschiedenen Interaktionen der NVU wiederfinden. Die Stimulation des ephrinB2/EphB4-Signalwegs durch einen retroviralen Vektor, genauer ein EphB4-Fc, führte durch eine Festigung der Endothel-Perizyten-Interaktion zur Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke und reduzierte die Extravasation mit folgender Ödembildung (Ghori et al., 2017).

Um den Beitrag von ephrinB2 in unterschiedlichen Zellarten zu differenzieren, entwickelte ein Forschungsteam aus Münster eine spezielle Mauslinie: Diese Mauslinie besitzt als genetische Veränderung einen CreERT-gesteuerten Knockout von ephrinB2 am Endothelzellen-spezifischen Promotor *CDH5* und wurde mit dem Namen *CDH5-CreERT2* bezeichnet. (Pitulescu et al., 2010).

Das cre / loxP-System ist ein spezifisches Rekombinationssystem, das häufig für den Knockout eines spezifischen Gens *in vitro* oder *in vivo* genutzt wird (Branda and Dymecki, 2004). Die Cre-Rekombinase ist ein Enzym aus der Bakteriophage P1 und kann eine spezifische inter- oder intramolekulare Rekombination von zwei loxP (locus of X-over of P1)-Abschnitten bewirken (Bouabe and Okkenhaug, 2013). Die Länge der loxP-Sequenz beträgt 34 Basenpaare, wobei durch deren Orientierung entweder einer Inversion des geflochten (flanked by loxP) Abschnitts oder eine Exzision bewirken kann (Bouabe and Okkenhaug, 2013). Die Genmodifikation kann zeitlich gesteuert werden, indem an die Cre-Rekombinase die Ligandenbindedomäne des humanen Östrogenrezeptor fusioniert wird, welche durch den selektiven Östrogenrezeptorantagonist Tamoxifen induziert werden kann (Feil et al., 1997).

In unserer Arbeitsgruppe wurde, basierend auf der beschriebenen Mauslinie, genetisch modifizierte Mäuse entwickelt, die den induzierbaren Knockout von ephrinB2 in Astrozyten oder Neuronen ermöglichen. Die Mauslinie mit dem an den Neuronen-

spezifischen Promotor *Thy1* gekoppelten spezifischen Knockout ist außerdem mit dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP = *engl.* yellow fluorescent protein) an ebendiesem Promotor weiter genetisch modifiziert. Orientierend wurde hierfür die Publikation von Young et al. verwendet (Young et al., 2008). Es entstand folglich die Mauslinie *EphrinB2 lox x Thy1-YFP-CreERT2*. In dieser Mauslinie sind Neurone ohne den Zusatz eines Farbstoffes unter dem Fluoreszenzmikroskop zu erkennen. Zusätzlich lässt sich durch die Gabe von Tamoxifen, ein Neuronen-spezifischer Knockout von *ephrinB2* aktivieren. In unserer Forschungsarbeit wird diese Mauslinie verwendet, um die genetisch fluoreszierenden Neurone als eine Komponente der NVU darzustellen.

### 7.3 Operationsverfahren

#### 7.3.1 Chronisch kraniales Fenster

Bei der Operationstechnik des CCW handelt es sich um eine Methode um den Kortex, bzw. seine Blutgefäße sowie einzelne Zellgruppen des Parenchyms, darzustellen. Diese Methode wird sowohl für Untersuchungen mittels IVM als auch für Untersuchungen mittels TPLSM verwendet und erlaubt es, *in vivo* (patho)physiologischen Prozesse des Gehirns zu untersuchen.

Die Implantation des CCW wurde in unserem Labor bereits etabliert und ausführlich beschrieben (Bayerl et al., 2016a). Im Sinne der 3R – *replace* (*dt.* vermeiden), *reduce* (*dt.* verringern) und *refine* (*dt.* verbessern) – führten wir die Operation des CCW und die Induktion des ischämischen Schlaganfalls, abgewandelt von der Vorgehensweise in der genannten Publikation, in einer OP-Sitzung durch. Die Vor- und Nachbereitung für die einzelnen Operationen dauert deutlich länger als die eigentliche Operation. Durch die Durchführung von beiden Operationen in einer Sitzung kann die Narkosezeit der Maus von zweimal ca. 45 Minuten auf einmal ca. 60 Minuten reduziert werden. Zudem müssen nur einmal postoperativ Schmerzmittel verabreicht werden und die Hautnaht über dem Operationsgebiet einmal weniger eröffnet werden. Auch in einer ähnlichen Publikation, welche die Veränderungen der BBB nach einem traumatischen Hirnschaden untersuchte, wurden die Operation des CCW für die TPLSM und die Intervention in einer OP-Sitzung durchgeführt (Schwarzmaier et al., 2015). Unsere Vorgehensweise wird im Folgenden ausführlich erläutert.

### **Ausstattung:**

- Operationsmikroskop
- Stereotaktischer Rahmen (ITEM Nr. 51731, Stelting Co., Illinois, USA)
- Rasierer
- Instrumente: Schere, chirurgische Pinzette, spitze Pinzette, Nadelhalter
- Elektrischer Bohrer (IDEAL, Micro-Drill, Part No. 67-1204, 3599, CellPoint Scientific, Gaithersburg, Maryland, USA)

### **Material:**

- Anästhesie: Ketamin/Xylazin-Gemisch (9 mg Ketamin-Hydrochlorid / 1 mg Xylazin pro 0,1 Kilogramm Körpergewicht, intraperitoneal)
- Bapanthen Augen- und Nasensalbe (5% Dexpanthenol, Bayer Vital GmbH, Leverkusen)
- Lokalanästhesie: Lidocain (Xylocain® 2%, AstraZeneca GmbH, Wedel)
- NaCl 0,9% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
- Sterile Saugtupfer (Sugi® Sponge Points, Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg)
- Gläsernes Deckglas, Durchmesser: 5mm (MENZEL-Gläser, LOT 0984 Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA / Menzel GmbH, Braunschweig)
- Kleber, bestehend aus zwei Komponenten: eine flüssige Komponente mit dem Inhaltsstoff Ethyl-2-Cyanoacrylat (CA-CYANO VENEER, REF 5302.01, SCHEU Dental Technology, Iserlohn) und ein pulveriger Kunststoff (Paladur, ISO 20795-1, type 2, class 1, KULZER, Mitsui Chemical Group, Hanau).
- Einmalkanüle 30 G (Sterican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
- Faden der Stärke 5-0 (PROLENE™ ETHICON®, Johnson & Johnson International, Norderstedt)
- Infektionsprophylaxe: Penicillin G (einmalig 0,2 Millionen Einheiten pro Kilogramm Körpergewicht, intramuskulär) (INFECTOPHARM®, Heppenheim)
- Postoperative Schmerzmittelgabe: Paracetamol 40 mg /ml Sirup (300 mg pro Kilogramm Körpergewicht, d.h. 13 ml Paracetamol-Saft pro 250 ml Trinkwasser) (Benuron Saft, bene-Arzneimittel GmbH, München)

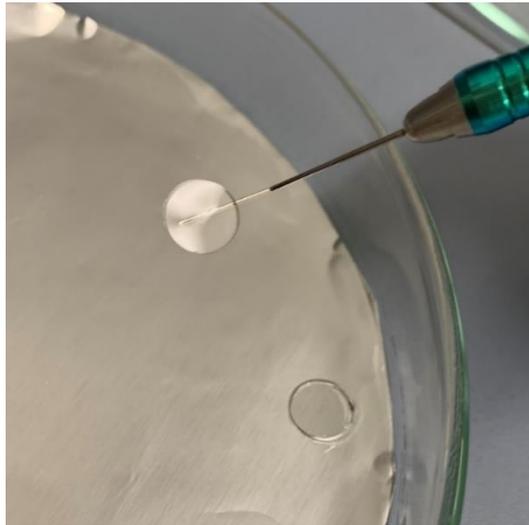
## **Vorgehensweise:**

1. Alle benötigten Instrumente werden vorbereitet auf den Operationstisch bereitgelegt, gründlich gereinigt und desinfiziert.
2. Die Maus wird anästhesiert und die Tiefe der Narkose durch einen Schmerzreiz in der Hinterpfote kontrolliert.
3. Das Fell über der Schädelkalotte wird rasiert, damit im Verlauf möglichst wenige Haare in das Operationsgebiet gelangen.
4. Die Maus wird in dem stereotaktischen Rahmen fixiert. Die Augen werden mit Bepanthen Augensalbe benetzt, um das Austrocknen während der Operation zu verhindern.
5. Die Haut wird an der rasierten Stelle gründlich gereinigt, desinfiziert und mit Lokalanästhesie benetzt.
6. Die Haut wird über eine Länge von ca. 2 cm medial in Längsrichtung über der Koronarnaht eröffnet und mit Hilfe von Nahtmaterial an den Schrauben des stereotaktischen Rahmens aufgespannt.
7. Fronto-parietal über der linken Hemisphäre wird mit Hilfe des Mikrobohrers eine osteoklastische Kraniotomie von ca. 4 mm Durchmesser durchgeführt. Die Größe der Kraniotomie sollte etwas kleiner sein als die anschließend aufzulegende gläserne Deckplatte. Die Blutgefäße und die gesamte kortikale Oberfläche müssen in diesem Schritt unbedingt geschont werden. Um Verbrennungen zu vermeiden, wird das Operationsgebiet während des Bohrens kontinuierlich mit NaCl 0,9% gespült. Vor dem Ankleben der Deckplatte werden die Ränder der Kraniotomie wieder trocken getupft.
8. Die gläserne Deckplatte mit einem Durchmesser von 5 mm wird auf der Kraniotomie platziert. Der Kleber wird mithilfe einer Kanüle um das Deckglas herum aufgetragen, sodass dieses an der Kalotte anhaftet und die Kraniotomie wasserdicht verschlossen ist. Der Kleber benötigt ca. 3-5 Minuten um zu trocknen.
9. Nach der Operation wird die Haut mit einer fortlaufenden Naht verschlossen und die Wunde nochmals mit Lokalanästhesie benetzt.
10. Um einer möglichen Infektion vorzubeugen, wird jeder Maus einmalig Penicillin G (0,2 Millionen Einheiten pro Kilogramm Körpergewicht) intramuskulär injiziert.

11. Anschließend wird die Maus auf einer Wärmeplatte platziert und bis zum vollständigen Aufwachen beobachtet. Als postoperative Schmerzmittelgabe werden 13 ml Paracetamol-Saft in 250 ml Trinkwasser aufgelöst.

#### 7.3.1.1 PDMS-Membran als Modifikation

Als Modifikation des CCW testeten wir die Herstellung einer silikonbasierten Polydimethylsiloxane-Membran anstelle der gläsernen Deckplatte. Vielversprechend erschienen uns das flexible Anlegen der Membran an die konvexe Kortexoberfläche sowie die Möglichkeit, durch die Membran hindurch Farbstoffe applizieren zu können. Für die Vorgehensweise wurde als Orientierung die Publikation von Heo et al. verwendet (Heo et al., 2016). Zusammengefasst besteht die Vorgehensweise darin, dass zwei flüssige Komponenten, genauer ein flüssiges Elastomer (*engl.* base elastomer) sowie eine Aushärtungs-Reagenz (*engl.* curing agent), zusammenführt und anschließend auf eine ebene Oberfläche gegossen werden. Die Dicke der Membran kann durch die Menge an Flüssigkeit bzw. die Fläche variiert werden. Für unsere Testungen wurde eine Dicke von ca. 1 mm angestrebt. Mittels Vakuumiergerät (Vakuum-Komplettsystem VP115/VK05, Artikelnummer: VKS011505, Silikonfabrik.de, Ahrensburg) wurden die flüssige Polymerschicht von Luftblasen befreit und anschließend bei 80 °C für ca. drei Stunden gebacken, bis die gewünschte, flexibel Konsistenz erreicht wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 zu erkennen.



**Abbildung 5:** Die fertige Polydimethylsiloxane-Membran direkt nach der Herstellung und mit einer Stanze in Form gebracht.

Die Verwendung der flexiblen PDMS-Membran mit diesem Herstellungsverfahren stellt eine adäquate Alternative zur Verwendung des gläsernen Deckglases dar. Der Vorteil gegenüber den gläsernen Deckgläsern liegt darin, dass sie z.B. für die Applikation von SR101 mit einer spitzen Nadel o.Ä. durchstoßen werden kann und sich anschließend wieder vollständig verschließt.

Im weiteren Verlauf entschieden wir uns jedoch wieder für die Verwendung eines gläsernen Deckglases, da diese Methode weniger Vorbereitungszeit bedarf und die Sterilität leichter gewährleistet werden kann. Für zukünftige Experimente wird die Etablierung dieser Methode jedoch mit Sicherheit von Bedeutung sein und Anwendung finden.

### 7.3.2 Distale Okklusion der A. cerebri media

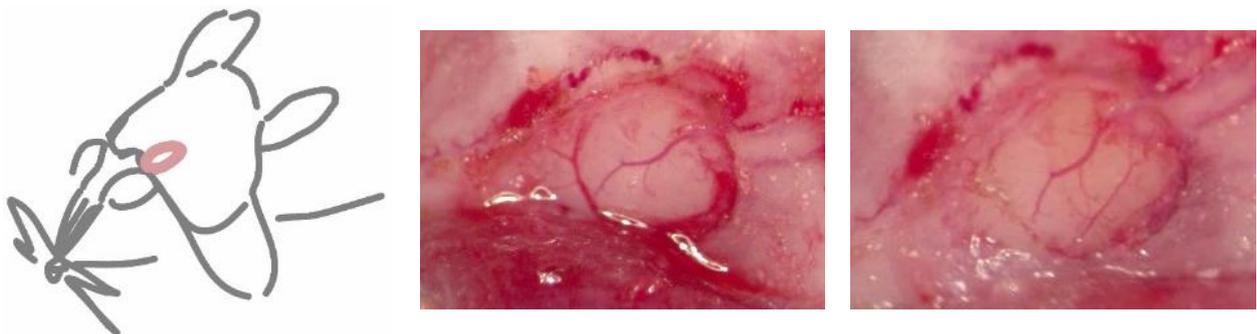
Für das Modell des ischämischen Schlaganfalls wurde die dMCAo gewählt. Mit diesem Modell können Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke nach ischämischem Schlaganfall besonders realistisch nachgebildet werden (Sommer, 2017).

Die Ischämie bildet sich bei erfolgreicher Durchführung gut abgrenzbar im Kortex aus (vgl. Abbildung 9) und ist somit sehr gut für *in vivo*-Untersuchungen mit begrenzter

Eindringtiefe geeignet (Bayerl et al., 2016a). In unseren Versuchen wurde stets die linke MCA (MCA = *engl.* middle cerebral artery) verschlossen. Die Vorgehensweise ist vielfach in der Literatur beschrieben, besonders ausführlich in einer Publikation von Llovera et al. (Llovera et al., 2014). Das von uns verwendete OP-Protokoll ist bereits ausführlich von unserem Labor dokumentiert worden (Bayerl et al., 2016a).

Die entscheidenden Schritte der Operation des distalen Schlaganfalls sind an dieser Stelle noch einmal ausgeführt: Zuerst wird lateral an der Kalotte der Musculus temporalis lappenförmig abpräpariert und eine ca. 2x3 mm durchmessende Osteotomie oberhalb des Os zygomaticum durchgeführt. Die Osteotomie befindet sich im besten Fall exakt über dem distalen Teil der linken MCA, falls notwendig kann sie erweitert werden.

Die nun zu erkennende MCA wird anschließend mit Hilfe einer bipolaren Pinzette (REF: 20195-022, LOT: 84974, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen) koaguliert, sodass der Blutfluss in den kortikalen Versorgungsbereich dauerhaft unterbrochen wird (vgl. Abbildung 6).



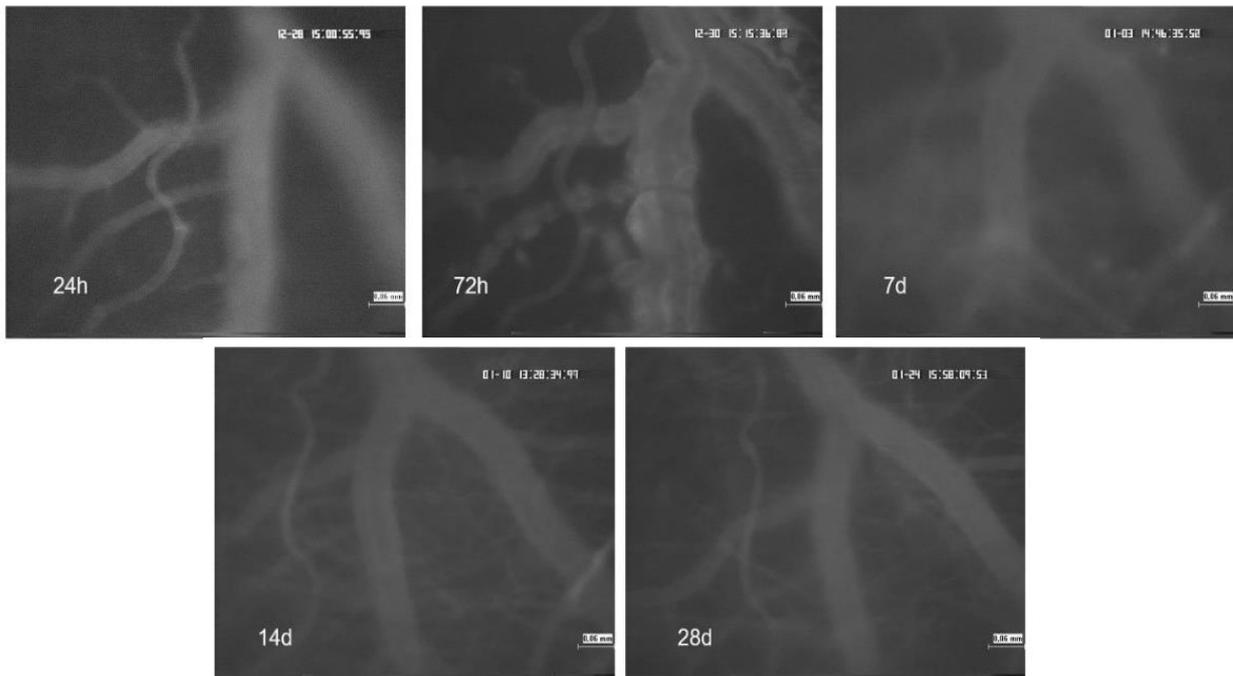
**Abbildung 6:** Die Operation der dMCAo: Links skizziert die Lage des OP-Gebiets, in der Mitte die MCA nach der Osteotomie und rechts nach der Okklusion mittels Elektrokoagulation.

Nach der Koagulation wird die Osteotomie durch die Refixierung des Muskellappens mittels einer Einzelknopfnahse der Stärke 7-0 (PROLENE TM, ETHICON®, Johnson & Johnson International, Norderstedt) bedeckt.

Für die ShamOP wurde ausschließlich der erste Abschnitt, die Muskelpräparation und die Osteotomie mit anschließender Refixierung des Muskellappens, durchgeführt. Es erfolgte keine Koagulation der MCA.

### 7.3.2.1 Orientierung innerhalb des chronisch kranialen Fensters

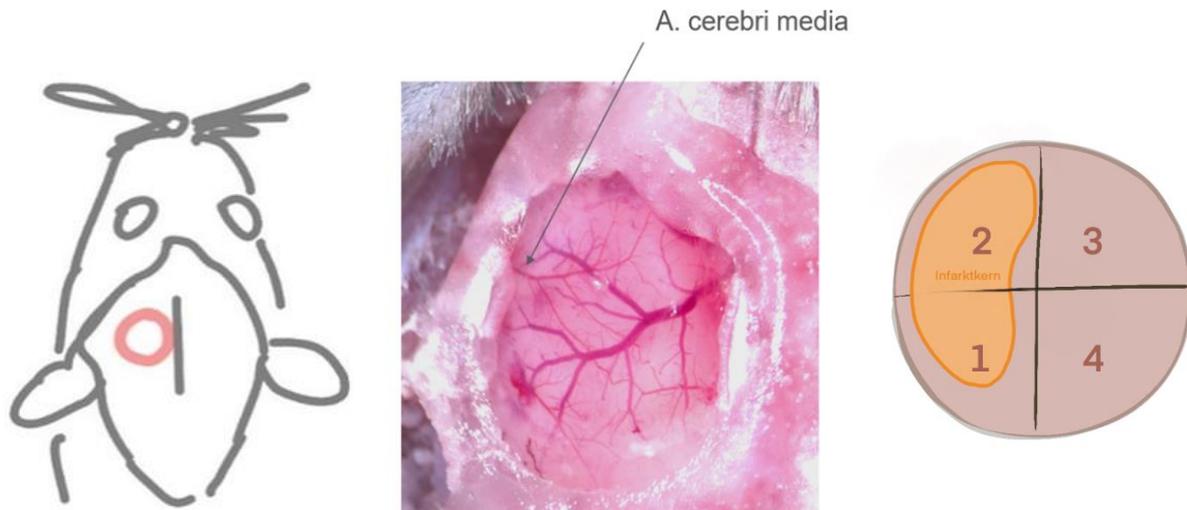
Durch das Mikroskop ist, je nach Konfiguration des Objektivs, nur ein sehr kleiner Ausschnitt des CCW zu erkennen. Zunächst wählten wir die Orientierung an markanten Gefäßen. Ein Beispiel einer Aufnahme des gleichen Aufnahmeareals ist in Abbildung 7 an den Aufnahmen mittels IVM zu erkennen.



**Abbildung 7:** Dargestellt sind fünf Aufnahmen mittels IVM (20-fache Vergrößerung), die das gleiche Blutgefäß über einen Messzeitraum von 28 Tagen zeigen. Die Aufnahmezeitpunkte waren 24 Stunden nach der OP, 72 Stunden nach der OP, Tag 7, 14 und 28. Bei dieser Maus wurde lediglich ein CCW operiert. Das Gefäß wurde alleinig durch den optischen Eindruck wiedergefunden. Maßstabsleiste = 0.06 mm.

Im Verlauf wählten wir eine andere Methode: Wir kennzeichneten das Deckglas an definierten Stellen mit leichten Materialabtragungen, welche wir bei der Justierung des Sichtfensters unter dem Okular als Orientierungshilfe verwendeten. Für die Kennzeichnung verwendeten wir einen Markierungsstift für Glas, Keramik und Kunststoff (Markierungsstift, Artikelnummer ALX2.1, Roth, Karlsruhe).

Es erfolgte die Einteilung in vier Quadranten, die immer in der gleichen Reihenfolge aufgenommen wurden (vgl. Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Das Aufnahmesystem durch das CCW: Links ist schematisch die Lage des CCW in Relation zur Kalotte skizziert, in der Mitte eine photographische Aufnahme eines CCW direkt nach der OP und rechts die Einteilung in der Quadranten. Es ist zu erkennen, dass die MCA hauptsächlich den Quadrant 2 versorgt, welcher folglich mutmaßlich am meisten von der dMCAo betroffen ist.

Die Quadranten wurden in Infarktkern (1 und 2) und Peri-Infarktzone (3 und 4) eingeteilt. Diese Einteilung wurde zum einen aufgrund des optischen Eindrucks unter dem Mikroskop und zum anderen aufgrund des anatomischen Verlauf der Hirngefäße getroffen.

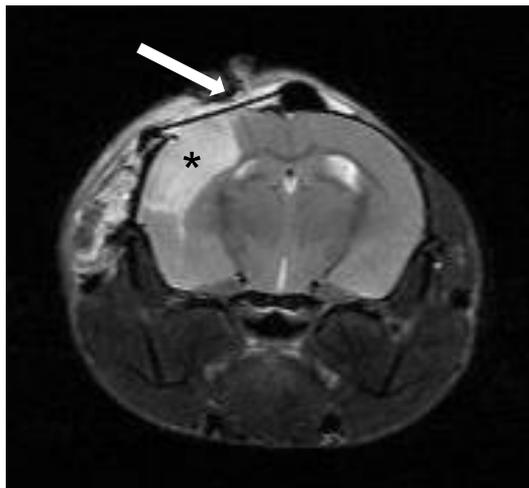
Die Quadranten 1 und 2 sahen unter dem TPLSM deutlich verändert gegenüber den Quadranten 3 und 4 aus. Die Veränderungen bezogen sich v.a. auf das Parenchym, das sich in den Quadranten 1 und 2 ödematös darstellte. Auch waren gerade zu den ersten Untersuchungszeitpunkten optische wesentlich weniger sehr kleine Blutgefäße in den Quadranten 1 und 2, als in den Quadranten 3 und 4 zu erkennen.

Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten ist die Blutversorgung durch Kollateralkreisläufe der A. cerebri anterior in den Bereichen, welche näher an der Fissura longitudinalis gelegen sind, wahrscheinlicher (Xiong et al., 2017).

### 7.3.2.2 Magnetresonanztomographie

Jede Operation der dMCAo wurde im Zeitraum 24-72 Stunden nach der Operation mithilfe eines Kleintier-Magnetresonanztomographen kontrolliert (PharmaScan 70/16 US, Bruker Software Paravision 5.1, NeuroCure, Charité – Universitätsmedizin Berlin). Die Aufnahmen mittels Magnetresonanztomographie wurden unter Inhalationsnarkose durchgeführt, welche sich aus Sauerstoff (0,2 l/min), Stickstoff (0,8 l/min) und Isofluran (1-1,5 l/min) zusammensetzte. Bei erfolgreicher dMCAo ließ sich in der T2-Wichtung der Aufnahme der Infarktbereich erkennen. Es wurde stets darauf geachtet, dass dieser bis unter das CCW reichte. Falls der Infarktbereich nicht zu erkennen war, wurde die Maus nicht in die Wertung als Schlaganfall-Versuchstier eingeschlossen.

Ein Beispiel für eine erfolgreich dMCAo, deren Infarktbereich bis mittig unter das CCW reicht, ist in Abbildung 9 zu erkennen.



**Abbildung 9:** Beispielhaft eine Magnetresonanztomographie-Aufnahme in T2-Wichtung 24 Stunden nach dMCAo mit Darstellung des Infarktbereichs (Stern) unterhalb des CCW (Pfeil).

#### 7.4 Intravital-Epifluoreszenz-Videomikroskopie

Mithilfe der IVM ist es möglich, einen einzigen Fluoreszenzfarbstoff durch die entsprechende Konfiguration des Filterblocks aufzunehmen. Auch unser Labor ist noch in Besitz eines derartigen Mikroskops, dessen Aufbau nur geringfügig von dem Aufbau eines im Jahr 1997 beschriebenen Mikroskops abweicht (vgl. Abbildung 10) (Harris et al., 1997).

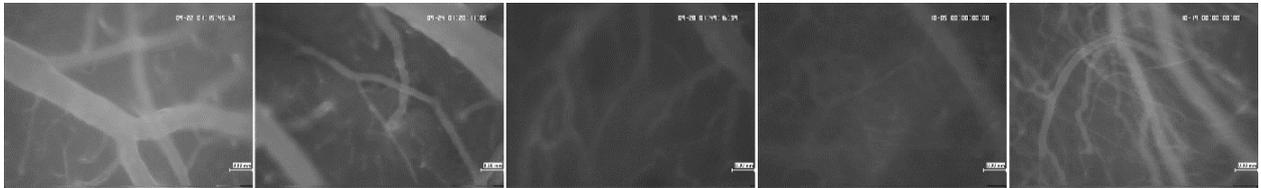


**Abbildung 10:** Die Geräte der IVM in unserem Labor

In unseren Untersuchungen verwendeten wir die IVM, um die Operationen von CCW und dMCAo zu validieren und einen Eindruck von der Neubildung der Gefäße nach der dMCAo zu gewinnen. Für die Aufnahmen wurde das Axiotech Vario IVM mit 20x „water-immersion“ Objektiv (Zeiss) verwendet. Die Anregung erfolgte mit einer HBO 100 W Quecksilberdampfampe (AttoArc, Zeiss). Die Blutgefäße wurden in allen Ebenen insgesamt für ca. 20 Sekunden mit einem Kamerachip (CF 8/1 FMC, KAPPA) und einem S-VHS Videoaufnahmesystem (Panasonic) aufgenommen. Die IVM wurde lediglich für die Gefäßdarstellung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran verwendet. Der dazugehörige Filterblock besaß die folgenden Konfigurationen: Anregungsfilter 450-490 nm, Strahlenteiler 510 nm und Emissionsfilter 515-565 nm.

Vor Messbeginn wurde die zu untersuchende Maus anästhetisiert und anschließend in Narkose FITC-Dextran intravenös, retroorbital injiziert. Durch das gefilterte blaue Licht der Quecksilberdampfampe ließen sich die von Blut und FITC-Dextran durchströmten

Gefäße unterhalb des CCW darstellen. Die Aufnahmen in Abbildung 12 und Abbildung 11 wurden zu Beginn der Arbeit aufgenommen und entstanden daher in einem beliebigen Teil innerhalb des CCW. Später hielten wir uns streng an das in 7.3.2.1 beschriebene Aufnahmesystem mit der Einteilung in die vier Quadranten.



**Abbildung 12:** Zeitverlauf der Gefäßregeneration einer Maus nach der ShamOP (Tag 1, Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 28). Maßstabsleiste = 0,06 mm.

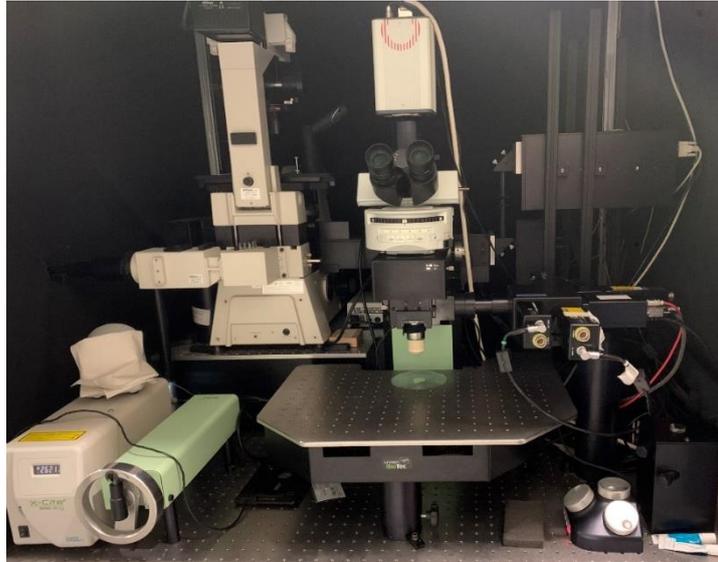


**Abbildung 11:** Zeitverlauf der Gefäßregeneration einer Maus nach der dMCAo (Tag 1, Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 28). Maßstabsleiste = 0.06 mm.

Wie beschrieben wurden zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten kurze Videosequenzen aller Fokusebenen aufgenommen. Diese wurden anschließend mit der Software CapImage (Zeintl Software Engineering, Heidelberg, Germany) dargestellt. Für die systematische Datenerfassung entschieden wir uns alleinig die TPLSM zu verwenden.

## 7.5 Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie

Für die vorliegenden Messungen wurde eine Kooperation mit den Arbeitsgruppen *Niesner* und *Hauser* des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums geschlossen. Der Aufbau des TPLSM beinhaltet einen Scankopf (TriMScope, LaVision – a Miltenyi BioTec Company, Bielefeld, vgl. Abbildung 13) und als Anregungsquellen den pulsierenden Titan:Saphir (Ti:Sa)-Laser (Ti:Sa, Chameleon Ultra II, Coherent, Glasgow, UK) sowie einen optisch parametrischer Oszillator (OPO) (APE *Angewandte Physik & Elektronik* GmbH, Berlin).



**Abbildung 13:** Der Messplatz des TPLSM des Deutsches Rheuma-Forschungszentrums.

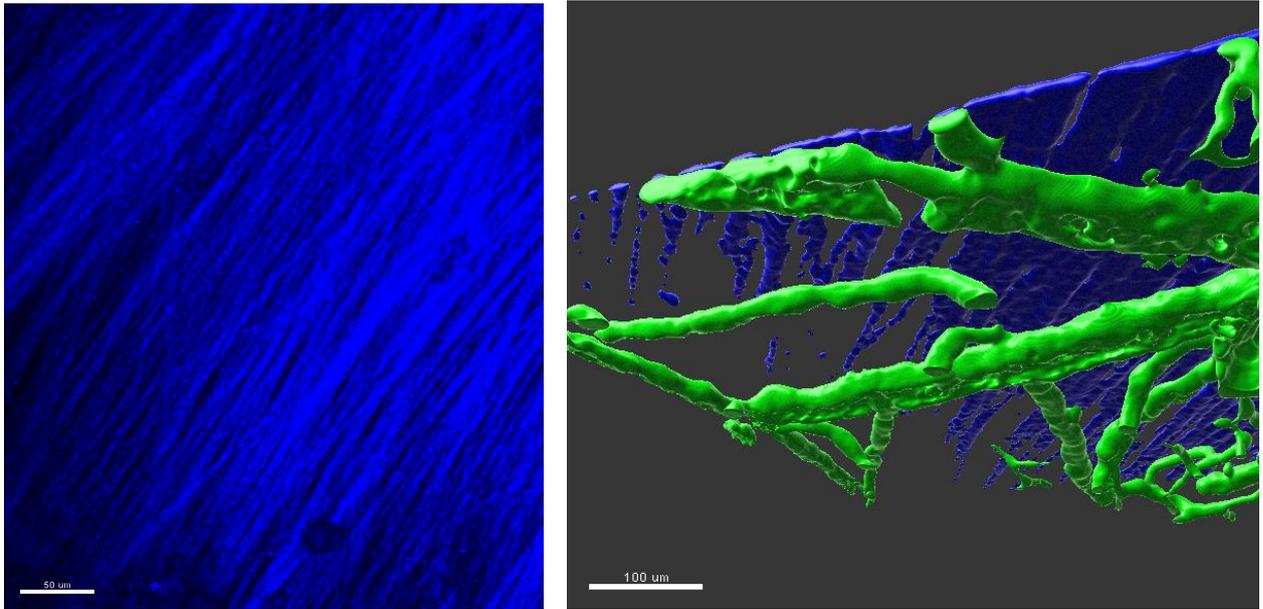
Alle Aufnahmen wurden mit einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung (W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC CG = 0.17) generiert. Die Photoelektronenvervielfacher (PMT = *engl.* photomultiplier tube) besaßen die folgenden Konfigurationen: 466 nm  $\pm$  20 nm, 525 nm  $\pm$  25 nm, 593 nm  $\pm$  20 nm und 655 nm  $\pm$  20 nm.

Für die Aufnahme der Daten, die wir später statistisch ausgewertet haben, wählten wir stets ein Aufnahmebereich der Größe 500  $\mu$ m \* 500  $\mu$ m. Wir nahmen anschließend einen z-Stack mit 100  $\mu$ m Tiefe und einer Schrittgröße von 0,5 bzw. 2  $\mu$ m auf.

### 7.5.1 Second Harmonic Generation (SHG)

Ein nutzbarer Effekt in der TPLSM ist das Phänomen der Frequenzverdopplung (SHG = *engl.* second harmonic generation), der bei nicht-zentrosymmetrischen Strukturen beobachtet werden kann. Es handelt sich um ein optisches Phänomen, bei dem zwei Photonen einer Wellenlänge  $x$  mit einer supramolekularen Struktur interagieren und darauffolgend ein neues Photon mit der Wellenlänge  $\frac{x}{2}$  (doppelte Frequenz) generieren. Praktischen Nutzen findet dieses Phänomen v. a. in der Darstellung von Kollagenfasern in verschiedenen Bindegewebsarten und inneren Organen (Campagnola, 2011).

Bei unseren Untersuchungen war das Phänomen für die Darstellung der kollagenen Fasern der Dura mater nützlich (vgl. Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Darstellung des optischen Phänomens SHG. *Links:* die Dura mater in der TPLSM. Maßstabsleiste = 50 µm. *Rechts:* eine Rekonstruktion der Dura mater (Blau) und der darunter verlaufenden Blutgefäße (Grün). Maßstabsleiste = 100 µm.

Die Dura mater wurde als Orientierung während der Messungen verwendet. Um die Dura mater im blauen Kanal (PMT 466 nm) zu sehen, ermittelten wir als optimale Anregungswellenlänge 930 nm.

## 7.5.2 Benutzung des Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskops

Um die Einarbeitung für zukünftige Gruppen zu erleichtern, teile wir unsere selbst verfasste Anleitung zur Benutzung des beschriebenen TPLSM am Charité Crossover.

### **Einschalten des Mikroskops:**

**CAVE:** Vor Beginn der Arbeit kontrollieren, ob die beiden Kühlsysteme funktionieren! Das Rotieren der beiden Ventilatoren zeigt die Funktionstüchtigkeit an, die Temperatur sollte bei ca. 20 Grad liegen. Am Boden darf sich kein Leck befinden.

1. Computer einschalten. Der Schalter befindet sich ganz unten, in der Klappe.
2. Alle 4 Einheiten über dem Computer der Reihe nach von oben nach unten einschalten (TSCPC *nicht* einschalten).
3. Den Ti:Sa-Laser von „Standby“ auf „On“ stellen. Dazu den Schlüssel um  $\frac{1}{4}$  Drehung nach rechts drehen. 10-15 Minuten warten, bis das System initialisiert wurde.
4. OPO einschalten – *auch, wenn man dies nicht verwendet!* Dazu den kleinen grünen Knopf an der Unterseite der Steuereinheit (Logo: IPC2U) gedrückt halten, bis die Anzeigelampe oben auf grün wechselt.
5. Quecksilberdampfampe (X-Cite Series 120Q) einschalten, aber den Regler noch bis auf „0“ herunterreguliert lassen.

### **Systemeinstellungen mit der Probe *Convallaria* testen** (einmal ganz zu Beginn):

6. Destilliertes Wasser auf die Probe geben.
7. Den Tisch erhöhen. Dazu die Kurbel am Steuerpult (links) nach rechts drehen, um den Tisch nach oben zu fahren – und zwar bis das Objektiv leicht das Wasser (*nicht* das Deckglas) berührt.
8. Den Strahlengang blocken, dazu „Metallkasten rein“, rechts vom Okular. Dieser Schritt verhindert, dass das Licht der Quecksilberdampfampe auf den Ti:Sa reflektiert.
9. Dichroid Mirror entfernen: Den silbernen Metallstab links am Okular herausziehen, bis ein „*Klick*“ zu hören ist.
10. Shutter öffnen: Neben dem Okular den Hebel von hinten nach vorne ziehen.

11. Die Helligkeit der Quecksilberdampfampe einstellen. Dazu am Rad drehen, um die Helligkeit zu verändern (ca. 3. Stufe).
12. Unterhalb des Okulars an der Drehscheibe den Filter auswählen: DAPI, FITC oder TRITC. Für die Untersuchung von *Convallaria* empfiehlt es sich, FITC auszuwählen.
13. Nun die korrekte Fokusebene mit der Steuerung des Objektivs (rechte Steuereinheit) suchen. Dazu als erstes den Abstand von Okular und Probe vergrößern, danach langsam verkleinern.  
Um das Okular zu bewegen: *oben* → z-Ebene (linksherum = weiterer Abstand; rechtsherum = näher an der Probe heran) – *links* → y-Ebene (Bewegung nach vorne und hinten) – *vorne* → x-Ebene (Bewegung nach rechts und links).

#### **Wenn man die richtige Ebene gefunden hat:**

14. Die Quecksilberdampfampe anlassen, aber auf Stufe „0“ herunter regulieren.
15. Shutter schließen, dazu den Regler nach hinten schieben.
16. Dichroid Mirror in den Strahlengang setzen. Dazu den silbernen Metallstab hineinschieben, bis ein „*Klick*“ zu hören ist.
17. Den Strahlengang entblocken, dazu den Metallkasten herausziehen.
18. Den Abdunklungsvorgang mittels Klettverschlüssen sorgfältig verschließen.

#### **Einstellungen am Computer:**

19. Die Software *InspectorPro 208* starten und die Parameter entsprechend den Einstellungen auswählen.
20. Folgenden Filter sind auszuwählen:

PTM1	466 nm ± 20 nm (blau)
PTM2	525 nm ± 25 nm (grün) ( <i>Anm:</i> PTM2 stets max. auf 95% setzen!)
PTM3	593 nm ± 20 nm (rot)
PTM4	655 nm ± 20 nm (hellrot, wird oftmals grau dargestellt)

Zu Beginn: Alle Werte auf 90% setzen.
21. Die Laserpower zu Beginn stets niedrig halten. Für die Messung der Probe *Convallaria* sind 3-5% ausreichend.

22. Livemessung starten (Button: grüne, kreisenden Pfeile).
23. Falls notwendig, kann nun auch nochmals die Fokusebene angepasst werden.  
Hierzu das Mausrad bewegen.
24. Die Messeinstellungen können nun mithilfe der Software weiter angepasst werden. Falls es zu keinen Komplikationen gekommen ist, kann nun die Probe gegen das zu messenden Objekt ausgetauscht werden.

#### **Wechsel der zu messenden Probe:**

25. Schritte 18-16 und 7 in entgegengesetzter Reihenfolge durchführen (Kurz: Abdunklungsvorhang öffnen, Metallkasten hineinschieben, Metallstab herausziehen, Tisch nach unten kurbeln).
26. Die zu messenden Probe kann nun gewechselt werden. Anschließend werden die Schritte 7-25 erneut durchgeführt.

#### **Beenden der Messungen:**

27. Probe von dem Messplatz entfernen (vgl. Schritt 25).
28. Schritt 1-5 in entgegengesetzter Reihenfolge durchführen. (Kurz: Quecksilberdampfampe ausschalten, OPO ausschalten (Betriebssystem an dem Steuerbildschirm herunterfahren), Ti:Sa-Laser auf „Standby“ stellen, die 4 Einheiten über dem Computer ausschalten, Computer herunterfahren).
29. Nach Ende der Untersuchungen alle Geräte den Arbeitsplatz reinigen.

(Anm.: Es empfiehlt, abzusprechen, ob jemand direkt im Anschluss für eine Untersuchung eingetragen ist – in diesem Fall kann auf Schritt 28 verzichtet werden.)

### 7.5.3 Größe des Aufnahme Fensters und Methode *Tile Scan*

Vor Beginn der Aufnahme am TPLSM ist es möglich, die Größe des Aufnahme Fensters festzusetzen. Wir verwendeten für unsere für unsere systematische Datenerfassung stets eine Größe von 505 µm x 505 µm mit einer Pixelanzahl von 500 x 500. Diese Parameter lassen sich jedoch variieren.

Außerdem besteht die Möglichkeit in einer festgesetzten Reihenfolge mehrere Bilder im Sinne eines Mosaiks aufzunehmen und diese anschließend zusammensetzen. Diese Methode wir als *Tile Scan* bezeichnet. Die Bilder sollten stets um ca. 10% der Bildbreite überlappend aufgenommen werden, damit das spätere Zusammensetzen möglich ist. Ein Beispiel einer solchen Aufnahme des gesamten CCWs ist in Abschnitt 8.2.2 dargestellt.

## 7.6 Fluoreszenzfarbstoffe

### 7.6.1 Sulforhodamin 101

Erstmalig beschrieben Nimmerjahn et al. im Jahr 2004 die Anwendung des Farbstoffs Sulforhodamin 101 (SR101) für die spezifische *in vivo* Färbung von Astrozyten und Darstellung mittels TPLSM. Die Autoren haben damals die durch andere Methoden bekannte Morphologie der protoplasmatischen Astrozyten des Neokortex in den durch SR101 angefärbten Zellen wiedererkannt. Die spezifische Färbung von Astrozyten wurde durch die Überlagerung des Fluoreszenzsignals von SR101 mit dem des verstärkt Grün fluoreszierenden Proteins (eGFP = *engl.* enhanced green fluorescent protein P) von GFAP-eGFP transgenen Mäusen bestätigt (Nimmerjahn et al., 2004).

Der Mechanismus der spezifischen Aufnahme von SR101 durch Astrozyten war zu Beginn nicht umfänglich verstanden. Man ging lange von einem unbekanntem, spezifischen Transportersystem aus und vermutete, dass die Aufnahme und anschließende Ausbreitung von SR101 durch Gap Junctions ermöglicht wird (Nimmerjahn et al., 2004). Später wurde beobachtet, dass nach ca. 140 Minuten neben Astrozyten auch Oligodendrozyten den Farbstoff SR101 aufnehmen. Dieses Phänomen trat sowohl bei topischer Applikation auf der Kortexoberfläche, als auch bei intravenösen Injektion auf und konnte durch die Gabe des Gap Junction-Blockers *Carbenoxolone*

unterbunden werden (Hill and Grutzendler, 2014). Mittlerweile ist man sich sicher, dass der Thyroidhormontransporter OATP1C1 für die Aufnahme von SR101 in die Astrozyten verantwortlich ist (Schnell et al., 2015). Da Carbenoxolone ebenfalls um einen Blocker ebendieses Kanals handelt, können so auch die zuerst beobachteten Ergebnisse erklärt werden (Hulsmann et al., 2017).

Das maximale Absorptionsspektrum von SR101 in der CLSM liegt bei 578 nm und das maximale Emissionsspektrum bei 593 nm. Laut Nimmerjahn und Helmchen kann in der TPLSM kann die Anregungswellenlänge etwas freier zwischen 800 und 900 nm gewählt werden (Nimmerjahn and Helmchen, 2012). Wir konnten bestätigen, dass sich in diesem Bereich SR101 positive Zellen detektieren lassen, wählten jedoch für unsere Untersuchungen mithilfe des OPO eine Wellenlänge von 1100 nm für optimale Aufnahmen.

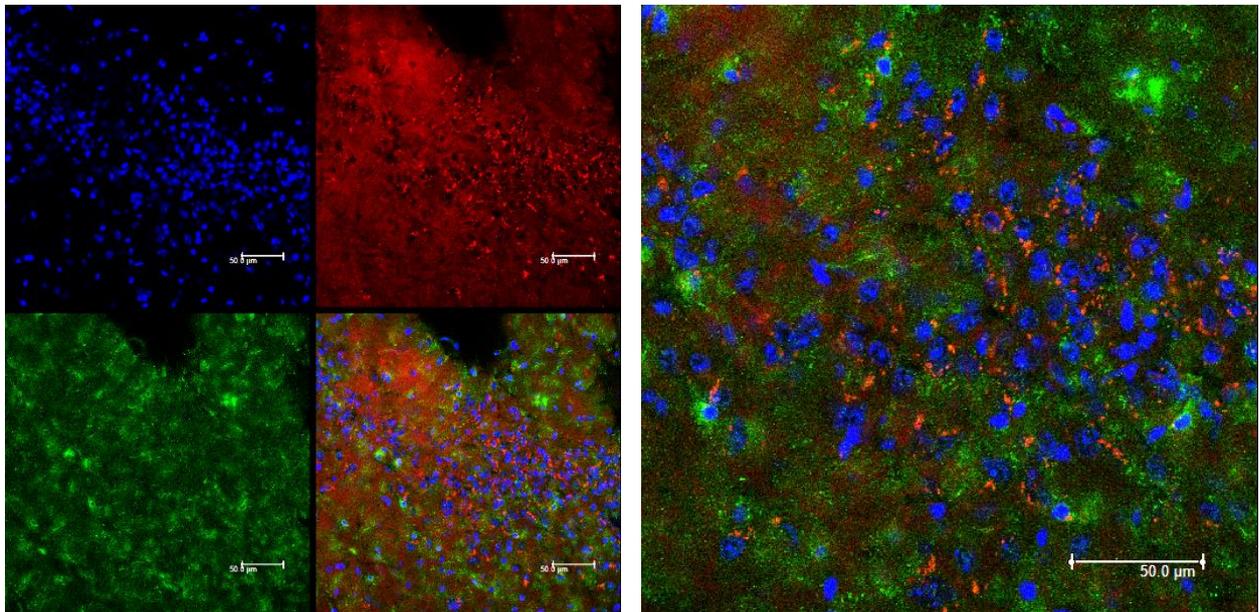
Für die intrakortikale Injektion von SR101 wandelten wir das bestehendes Protokoll geringfügig ab (Nimmerjahn and Helmchen, 2012). Konkret injizierten wir den Farbstoff SR101 (Sulforhodamin 101, S7635-100MG, 60311-02-6, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mithilfe einer Tumordinjektionspritze (Hamilton™ Mikroliterspritze, Modell 7001 KH SYR 1µl, Hamilton Company, Reno, Nevada, USA) 1µl in einer Konzentration von 1 Millimol in NaCl 0,9%. Die Injektion erfolgte ca. zwei Stunden vor der Untersuchung des Kortex mittels TPLSM.

In der Literatur konnten wir jedoch keine Angaben finden, ob SR101 auch nach ischämischem Schlaganfall für eine spezifische *in vivo* Färbung von Astrozyten verwendet werden kann. Aus diesem Grund stellten wir genaue Untersuchungen zu dieser Fragestellung an.

#### 7.6.1.1 Immunhistologische Untersuchungen

Zu Beginn führten wir immunhistologische Färbungen durch, um die unspezifische Färbung von immunreaktiven Zellen durch SR101 auszuschließen. Wir verwendeten hierzu das Gehirn einer Maus mit ischämischem Schlaganfall, die wir an Tag 28 nach der letzten Untersuchung mittels TPLSM erlöst hatten. Die letzte Injektion des Farbstoffs SR101 lag ca. 5 Stunden zurück. Die Gehirne wurden entnommen und in Isopentan fixiert. Anschließend wurden diese mithilfe eines Kryostats geschnitten und gefärbt. Mit

dem grün fluoreszierenden Marker CD11b wurden unspezifisch Immunzellen gefärbt und mit dem blau fluoreszierenden Marker DAPI die Zellkerne. Die Schnitte wurden mittels CLSM untersucht und die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. Wir konnten keine Anfärbung von Immunzellen durch den Farbstoff SR101 erkennen.



**Abbildung 15:** Aufnahmen mittels CLSM eines immunhistologisch gefärbten Hirnschnitts. Das Gehirn stammt von einer Maus an Tag 28 nach Schlaganfall. Zu erkennen sind Zellkerne (Blau), Astrozyten (Rot) und Immunzellen (Grün). Rechts in 40-facher Vergrößerung und Links in 63-facher Vergrößerung. Maßstabsleiste = 50 µm.

#### 7.6.1.2 Reportertiere : FVB/N-Tg(GFAPGFP)14Mes/J

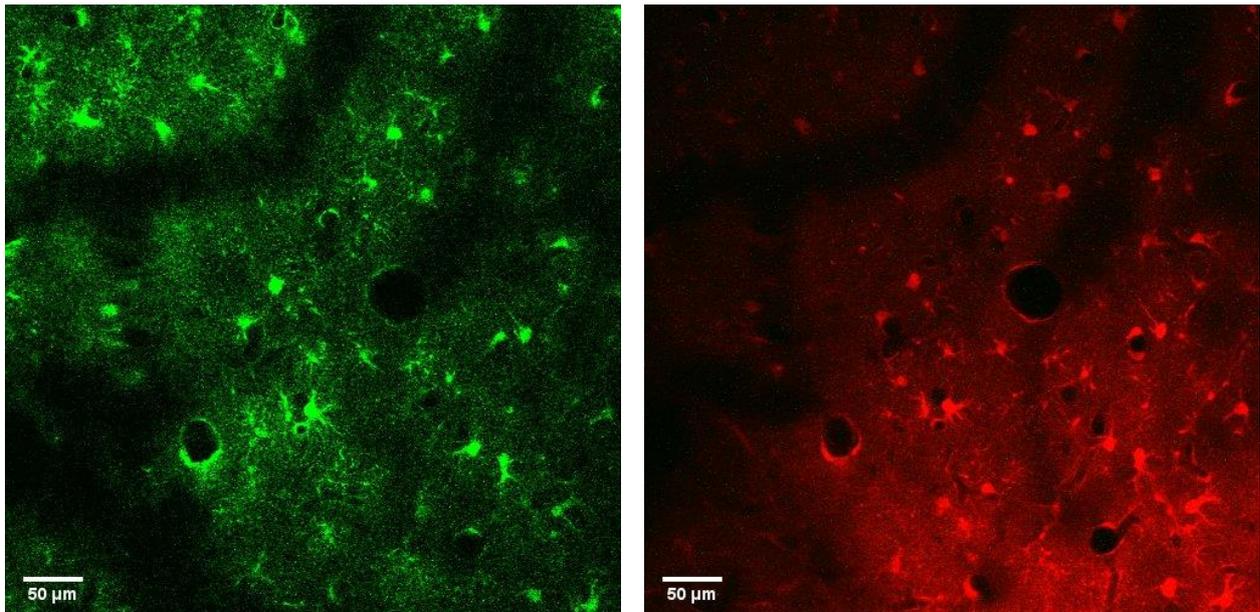
Im nächsten Schritt verwendeten wir Reportermäuse für Astrozyten, um die spezifische *in vivo* Färbung von Astrozyten durch SR101 nach ischämischem Schlaganfall zu beweisen.

Die genaue Bezeichnung der verwendeten Reportermäuse lautet: FVB/N-Tg(GFAPGFP)14Mes/J. Diese Mäuse tragen eine genetische Fluoreszenzmarkierung mit Grün-fluoreszierendem Protein an dem Protein GFAP, einem Referenzprotein für Astrozyten (vgl. 6.2.3). Erstmals vorgestellt wurden die GFAP-GFP transgenen Mäuse im Jahr 1997 (Zhuo et al., 1997).

Wir führten die Operationen des CCW und der dMCAo durch und injizierten den Farbstoff SR101 an Tag 3 nach der Operation wie beschrieben. Zwei Stunden nach Injektion

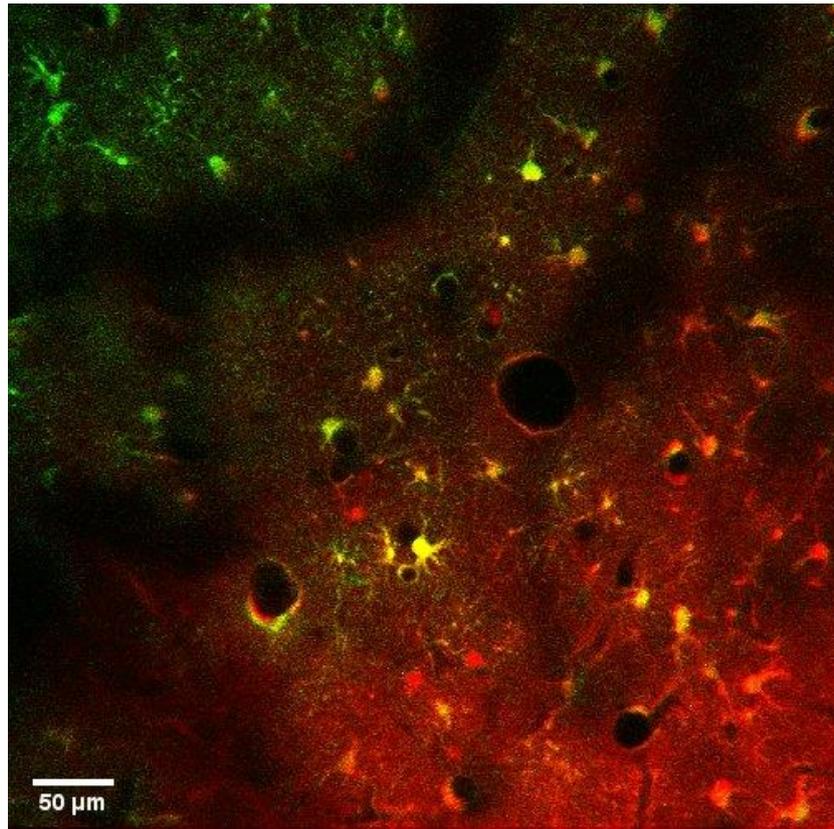
fürten wir die TPLSM mit zwei verschiedenen Wellenlängen durch: Zum einen mit der Wellenlänge 920 nm zur Anregung von GFP und zum anderen mit der Wellenlänge 1100 nm zur Anregung von SR101.

Die Aufnahmen aus der Peri-Infarktzone mittels TPLSM sind in Abbildung 16 dargestellt. Man kann in beiden Aufnahmen deutlich Zellkörper und deren sternförmige Ausläufer erkennen, wie ich sie in Abschnitt 6.2.3 beschrieben habe.



**Abbildung 16:** Die Aufnahmen von Astrozyten mittels TPLSM. Links: GFAP-GFP-positive Zellen, angeregt mit einer Wellenlänge von 920 nm. Rechts: SR101-positive Zellen, angeregt mit einer Wellenlänge von 1100 nm. Maßstabsleiste = 50 µm.

Dass es sich bei den Aufnahmen um dieselben Zellen handelt, wurde durch die Kolokalisation gezeigt. Dazu wurden beide Aufnahmen in der Software ImageJ zeitgleich dargestellt. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 zu erkennen.



**Abbildung 17:** Kolokalisation der GFAP-positiven Zellen und der SR101-positiven Zellen. Maßstabsleiste = 50  $\mu\text{m}$ .

#### 7.6.1 FITC-Dextran

Den Fluoreszenzfarbstoff FITC verwendeten wir in an ein Dextran konjugierter Form ([Mw] = 150 000 Da, SIGMA-ALDRICH GmbH) in einer Konzentration von 2% in NaCl 0,9%. Es wurden 0,1 ml intravenös, retroorbital kurz bevor der Mikroskopie injiziert.

#### 7.6.2 TRITC-Dextran

Des Weiteren verwendeten wir den Farbstoff Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC)-Dextran ([Mw] = 155 000 Da, SIGMAALDRICH GmbH, Darmstadt) in einer Konzentration von 5mg / ml NaCl 0,9%. Es wurden 0,1 ml intravenös, retroorbital kurz bevor der Mikroskopie injiziert.

### 7.6.3 Cascade Blue

Das in Abschnitt 6.4 beschriebene Ziel war die *in vivo* Darstellung von Neuronen, Astrozyten und Blutgefäßen in einer Messung mittels TPLSM. Da die Neurone genetisch mit YFP markiert waren und für die *in vivo* Markierung von Astrozyten bisher nur ein einziger Farbstoff bekannt ist, mussten wir für die Blutgefäße einen Farbstoff auswählen, dessen Emissionsspektrum sich von dem von SR101 und YFP unterscheidet. Wir verwendeten somit für die intraluminale Färbung des Gefäßsystems den Fluoreszenzfarbstoff Cascade Blue, ebenfalls in an ein Dextran konjugierter Form ([Mw] = 10 000 Da, invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Es wurden 0,1 ml intravenös, retroorbital in einer Konzentration von 12,5 mg / ml in NaCl 0,9% kurz vor der Mikroskopie injiziert.

Vergleichende Aufnahmen mittels TPLSM der drei genannten Gefäßmarker sind im Kapitel *Ergebnisse*, in Abbildung 26 zu erkennen.

## 7.7 Datenauswertung

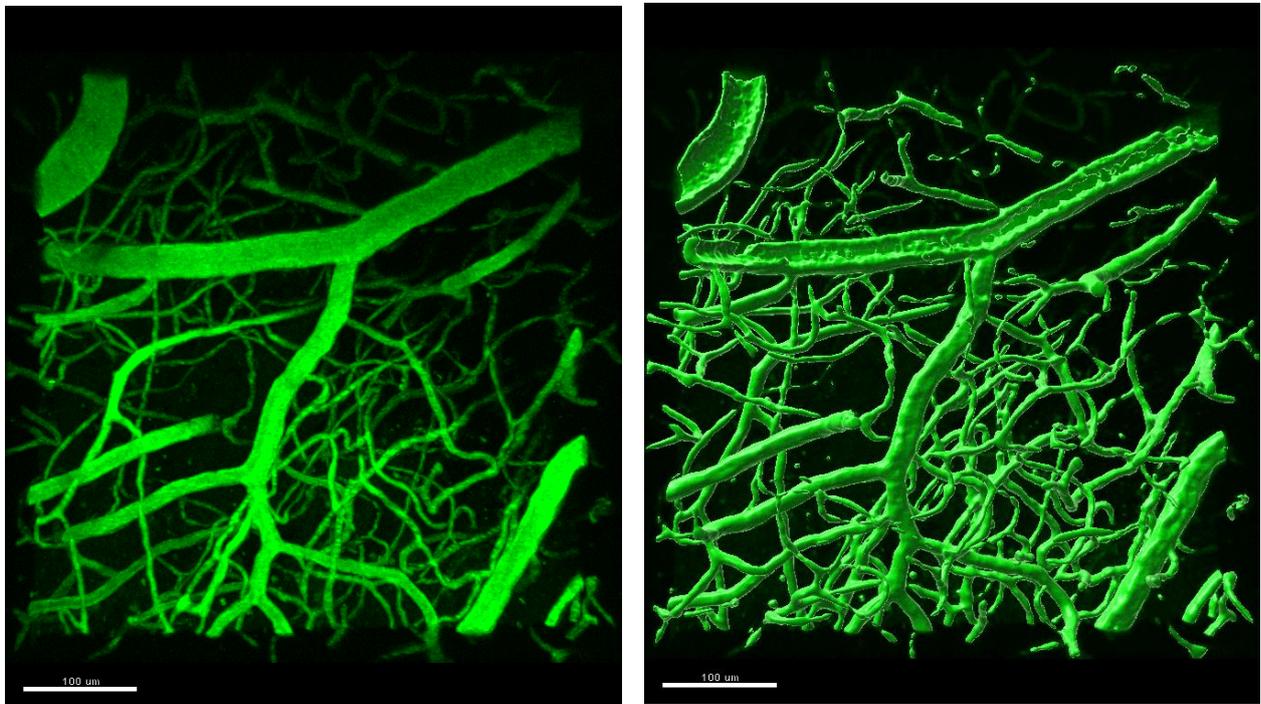
### 7.7.1 ImageJ

Mithilfe der Software *ImageJ* (Version 1.53a, public domain) konnten wir die aufgenommen z-Stacks öffnen, die verschiedenen Kanäle zusammenfügen und weitere Analysen durchführen. Für die Messung der Gefäßdurchmesser luden wir den jeweiligen z-Stacks des Kanals 525 nm in das Programm und erstellten anschließend eine maximale Projektion (Image → Stacks → Z Project). Es erfolgte hierdurch die Umwandlung des 3D-Bilds in eine 2D-Abbildung. In dieser Abbildung führten wir anschließend Messungen derjenigen Gefäße durch, die eine als Hilfslinie eingezeichnete Bilddiagonale (links oben nach rechts unten) schnitten. Durch diese Verfahren wurde somit eine repräsentative Auswahl der Gefäßdurchmesser getroffen.

### 7.7.2 Imaris

Für die Analyse der Blutgefäße verwendeten wir zudem das Bildverarbeitungsprogramm *Imaris* (Oxford Instruments, Abingdon, UK).

Die Funktion *Surface* der Software ermöglicht es, aus den Fluoreszenzsignalen 3D-Körper zu erstellen. Dabei können diverse Parameter, wie z.B. der Schwellenwerte der Intensität des Fluoreszenzsignals, verändert werden. Anschließend lassen sich die rekonstruierten Volumina hinsichtlich Anzahl, Volumen etc. quantifizieren. Um die Dichte der Blutgefäße zu quantifizieren, führten wir bei jedem der aufgenommenen Bilder eine Rekonstruktion der Blutgefäße durch. Wir verwendeten für die Rekonstruktionen zur statistischen Analyse die Softwareversion 9.5.1.



**Abbildung 18:** Beispielhaft dargestellt die Rekonstruktion von Blutgefäße mit Imaris. Links die Aufnahme mittels TPLSM und rechts die entsprechende Rekonstruktion. Maßstabsleiste = 100  $\mu\text{m}$ .

Bezüglich der systematischen Datenauswertung muss jedoch auf eine mögliche Fehlerquelle hingewiesen werden: Es war nicht möglich, immer alle Parameter exakt gleich einzustellen, da der Parameter *threshold* (dt. Schwellenwert) für jede Aufnahme unterschiedlich ausgewählt werden musste. In unserer Analyse wurde die Voreinstellung nicht verändert und somit die von dem Programm berechnete Einstellung übernommen. Die Auswahl des Schwellenwerts, ab welcher Größe und ab welcher Intensität ein Signal

als das gesuchte Objekt definiert wird, ist eine in der Literatur umfassend diskutierte Problematik.

Für das Zusammensetzen von einzelnen Aufnahmen zu einer größeren Übersichtsaufnahme des CCW (vgl. Abschnitt 8.2.2), verwendeten wir das Programm *Imaris Stitcher* (Oxford Instruments, Abingdon, UK).

### 7.7.3 GraphPad Prism und Microsoft Excel

Zur Analyse und Veranschaulichung der Daten nutzten wir die Statistiksoftware GraphPad Prism 9.1.2 (226) (Graphpad Software, Inc.). Unterstützend verwendeten wir für einige Rechnungen die Software Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation).

### 7.7.4 Berechnung der Gefäßdichte

Für die Berechnung der Gefäßdichte dividierten wir das errechnete Volumen durch das insgesamt aufgenommene Volumen.

Die Formel lautete:

$$\text{Gefäßdichte [\%]} = \frac{v_{\text{GefäÙe}}}{v_{\text{Gesamt}}}$$

$v_{\text{Gesamt}}$  betrug einheitlich für alle Aufnahmen:

$$\begin{aligned} v_{\text{Gesamt}} &= x * y * z = 500 \mu\text{m} * 500 \mu\text{m} * 100 \mu\text{m} \\ &= 25\,000\,000 \mu\text{m}^3 \end{aligned}$$

## 8 ERGEBNISSE

### 8.1 Aufnahmen mittels Intravital-Epifluoreszenz-Videomikroskopie

Die IVM hat einen wichtigen Stellenwert in unserer Forschungsarbeit eingenommen, auch wenn wir für den Großteil der Arbeit die TPLSM verwendeten. Die IVM eignete sich in unserem Forschungsvorhaben vor allem für die Validierung der Operationsmethoden CCW und dMCAo. Wir verwendeten die IVM zudem für die Darstellung von Blutgefäßen mithilfe von FITC-Dextran.

Die Vor- und Nachteile der IVM, auch im Vergleich zur TPLSM, werde ich detaillierter in Abschnitt 9.2.4 diskutieren.

### 8.2 Aufnahmen mittels Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie

#### 8.2.1 Grundlegende Erkenntnisse

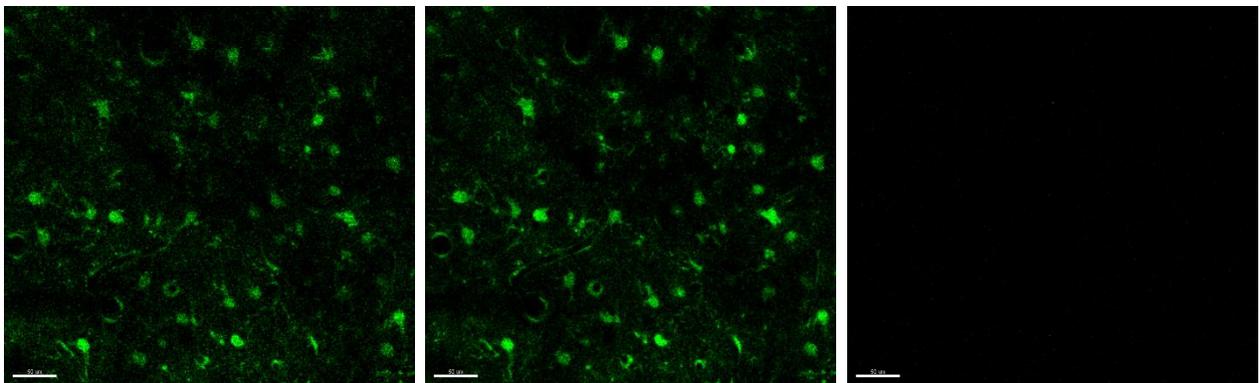
Vorabgehend sollen einige grundlegende Erkenntnisse für die erfolgreiche Durchführung von *in vivo* Aufnahmen mittels TPLSM dargelegt werden.

Es ist unumgänglich, sich vor Beginn der Untersuchungen intensiv mit den physikalischen Zusammenhängen zu befassen. Einen Teil davon habe ich in dieser Arbeit erläutert. Die Aufnahmen, die ich im Folgenden darstellen werden, sind entstanden, nachdem wir unsere Aufnahmeeinstellungen mehrere Male revidiert und von Grund auf neu konzipiert habe. Nachfolgenden Gruppen empfehlen wir besonderen Wert auf die folgenden Parameter zu legen:

- Aufbau für die zu untersuchende Probe, d.h. welche Hilfsmittel (z.B. stereotaktischer Rahmen, Wärmeplatte, Hilfsmittel für die Narkose etc.) sind notwendig und wie kann man diese am TPLSM verwenden?
- Welches Objektiv soll für die Messungen verwendet werden?
- Mit welcher Wellenlänge werden die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und ist der OPO (Wellenlängen  $> 1020$  nm) zu verwenden? In welchem PTM kann man die Emissionsspektren detektieren? Gibt es Überschneidungen der Emissionsspektren?

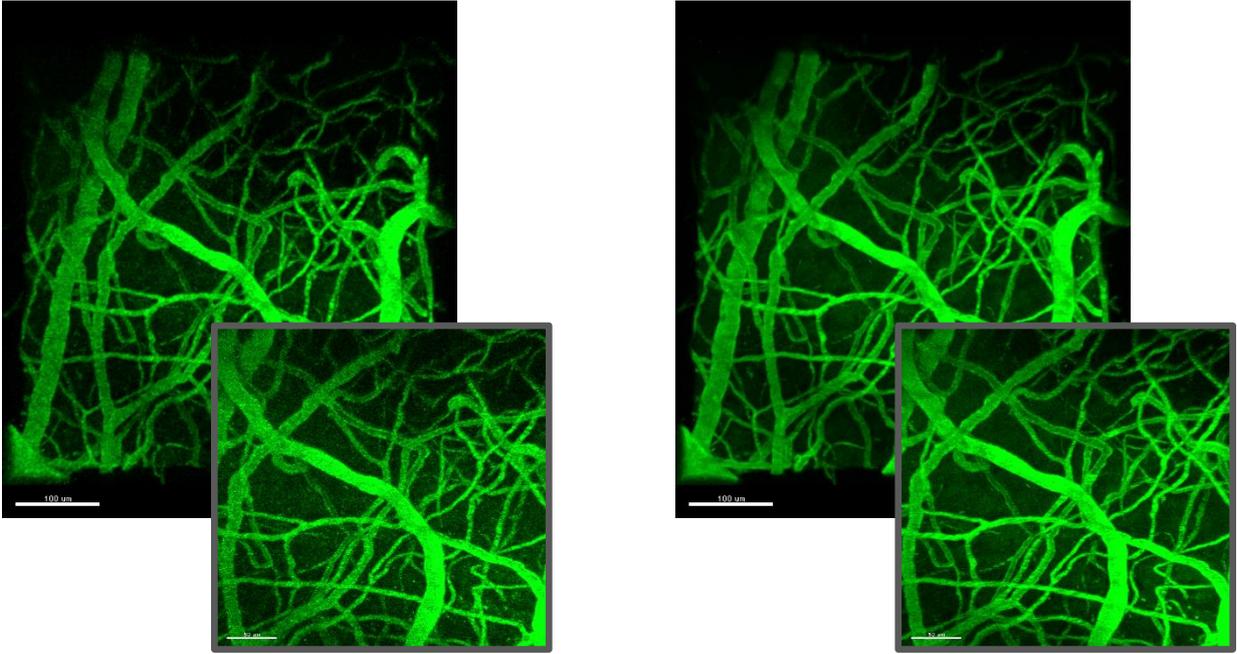
- Wichtige Parameter, die sich in der Software InspectorPro 208 modifizieren lassen: Größe des Bildausschnitts, Line Average (Empfehlung: Stufe „4“ reduziert störendes Rauschen bereits deutlich.), Höhe der Laserpower (Vorsicht vor zu hoher Laserpower, da das Gewebe geschädigt werden kann!), Signalverstärkung der PMTs, etc.

Zwei der genannten Einstellungen möchte ich vergleichend bildlich darstellen. Für die Anregung von SR101 identifizierten wir unter Verwendung des OPO die Wellenlänge 1100 nm als optimal (vgl. Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Messung des gleichen Bildausschnitts, mithilfe des Ti:Sa mit 850 nm (links), mit 930 nm (Mitte) und des OPO mit 1100 nm (rechts) an Tag 28 nach dMCAo. Maßstabsleiste = 50µm.

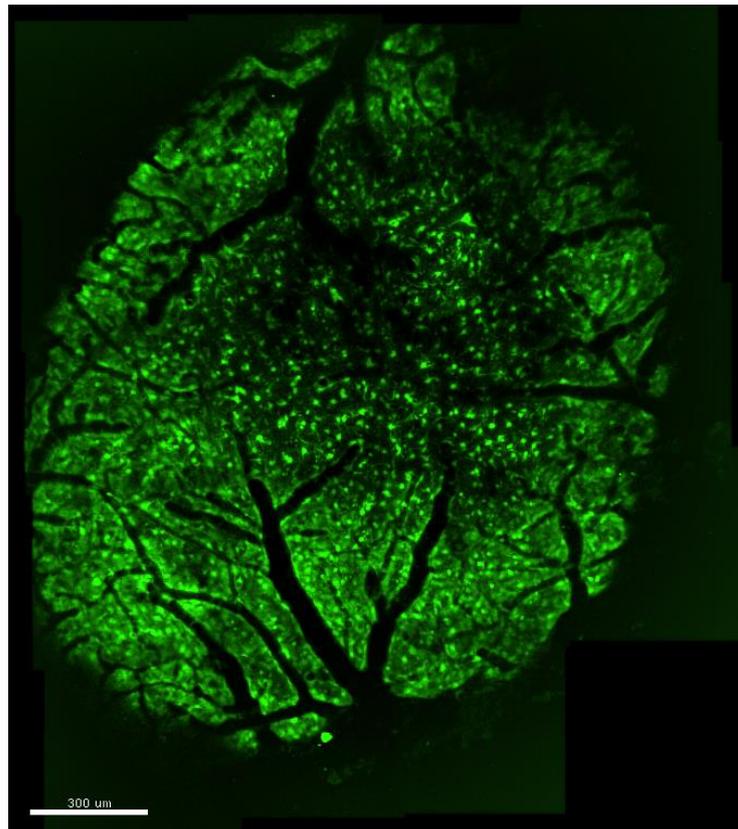
Die Korrektur durch die Funktion Line Average führt zu einer Reduktion des störenden Rauschens. Ein Beispiel ist in Abbildung 20 gezeigt.



**Abbildung 20:** Messung des gleichen Bildausschnitts mit Line Average 1 (links) und mit Line Average 4 (rechts) an Tag 28 nach ShamOP. Mithilfe von FITC sind Blutgefäße dargestellt. Gesamtes Bild: Maßstabsleiste = 50 µm, Bildausschnitt: Maßstabsleiste = 50 µm.

## 8.2.2 Darstellung des gesamten chronisch kranialen Fensters

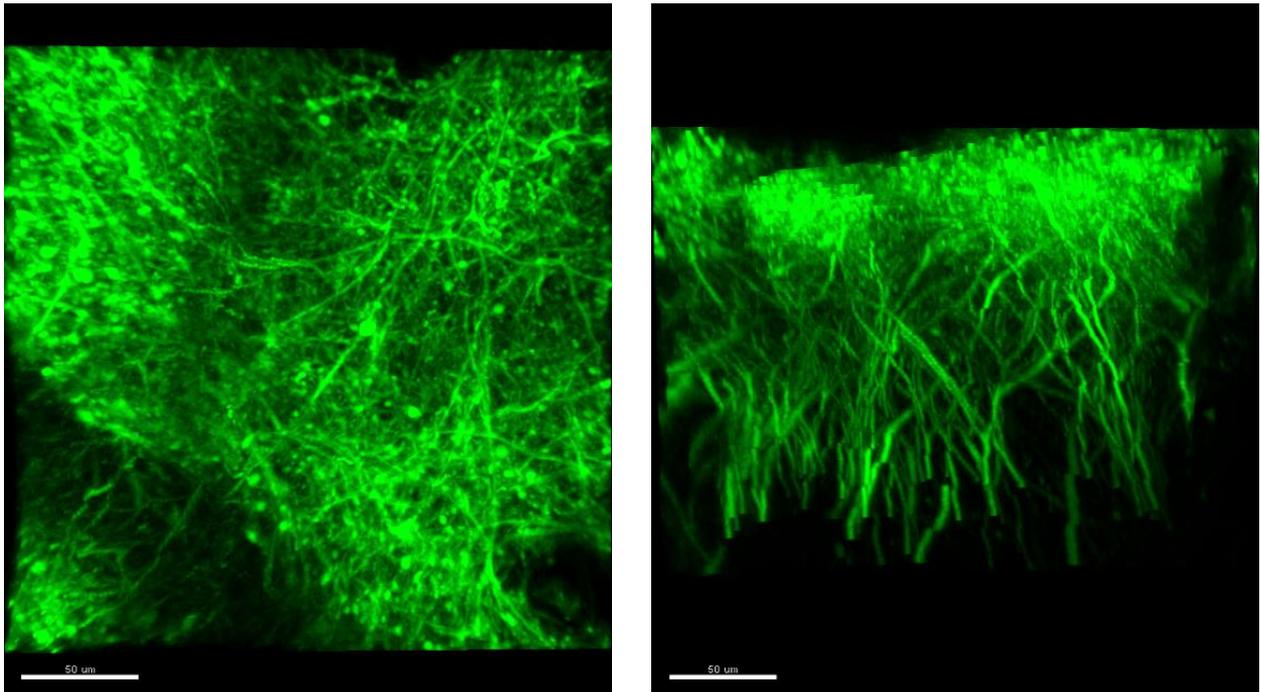
Mithilfe der in 7.5.3 beschriebenen Aufnahmemethode *Tile Scan* ist es gelungen, das gesamte CCW abzubilden. Beispielhaft ist die Aufnahme von Astrozyten im gesamten CCW einer GFAP-GFP-positiven Maus in Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21:** Darstellung des gesamten CCW, hier zu sehen Astrozyten einer GFAP-GFP-positiven Maus. Maßstabsleiste = 300 µm.

### 8.3 Darstellung von Neuronen

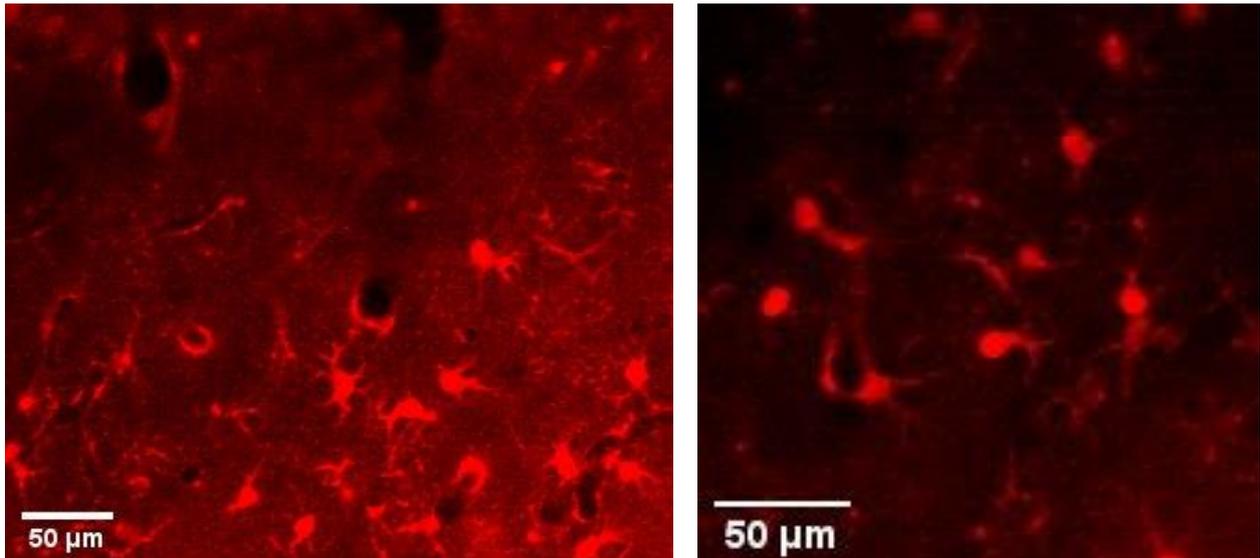
Die Darstellung von Neuronen gelang durch die Verwendung der in 7.2 beschriebenen Versuchstiere. Für die Anregung des Fluorophors *YFP* verwendeten wir eine Wellenlänge von 930 nm. Beispielhaft sind in Abbildung 22 mittels TPLSM generierte Aufnahmen von Thy-1-positiven Neuronen nach Operation des CCW dargestellt.



**Abbildung 22:** Die Abbildung zeigt in zwei verschiedenen Ansichten (links Aufsicht auf den Kortex, rechts sagittale Ansicht) die Aufnahme von YFP-markierten Thy1-positiven Neuronen mittels TPLSM. Maßstabsleiste = 50 µm.

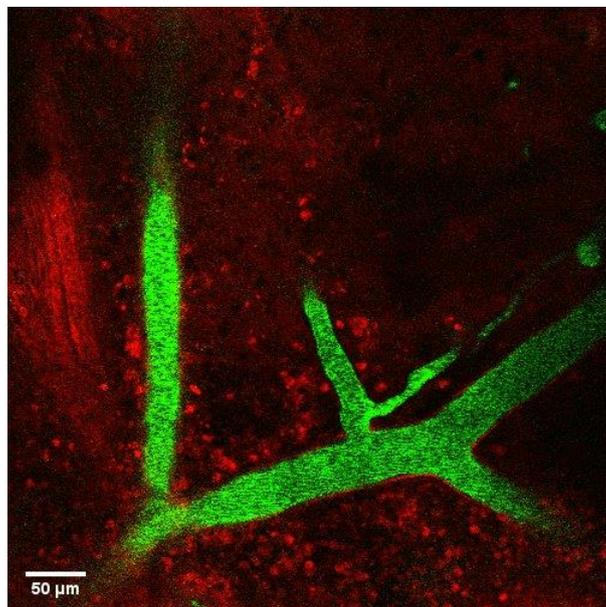
### 8.4 Darstellung von Astrozyten

Die Bestätigung der *in vivo* Färbung von Astrozyten durch SR101 wurde bereits ausführlich in Abschnitt 7.6.1.2 beschrieben. In Abbildung 23 sind noch einmal Aufnahmen von Astrozyten in der Peri-Infarktzone dargestellt, welche an Tag 3 nach ischämischem Schlaganfall durch die intrakortikale Applikation von SR101 angefärbt wurden.



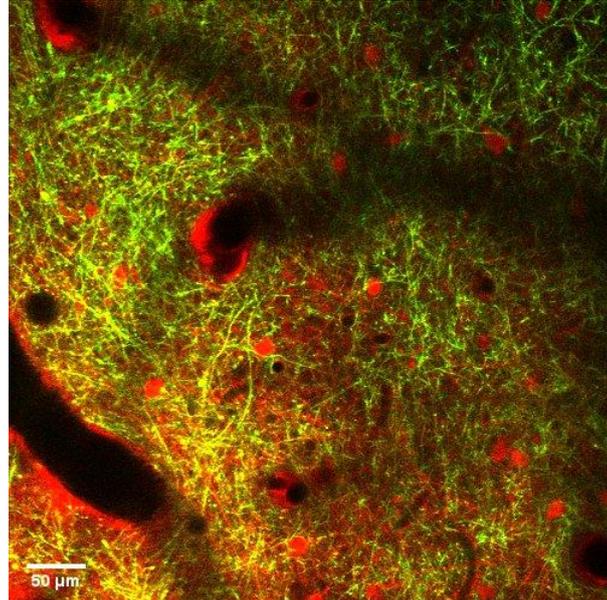
**Abbildung 23:** Darstellung von Astrozyten *in vivo* an Tag 3 nach ischämischem Schlaganfall mittels TPLSM durch die intrakortikale Applikation von SR101. Maßstabsleiste = 50 µm.

Es konnten zudem Astrozyten und Blutgefäße *in vivo* mittels TPLSM zeitgleich dargestellt werden. Das Beispiel einer Aufnahme aus der Peri-Infarktzone an Tag 3 nach dMCAo ist in Abbildung 24 dargestellt. Diese Aufnahme wurde mit einer Wellenlänge von 930 nm generiert.



**Abbildung 24:** Darstellung von Astrozyten (Rot, SR101) und Blutgefäßen (Grün, FITC-Dextran) mittels *in vivo* TPLSM an Tag 3 nach ischämischem Schlaganfall. Maßstabsleiste = 50 µm.

Die zeitgleiche Darstellung von Astrozyten durch SR101 und YFP-positiven Neuronen ist ebenfalls gut möglich. Das Beispiel einer Aufnahme, die mit einer Wellenlänge von 930 nm generiert wurde, ist in Abbildung 25 dargestellt.

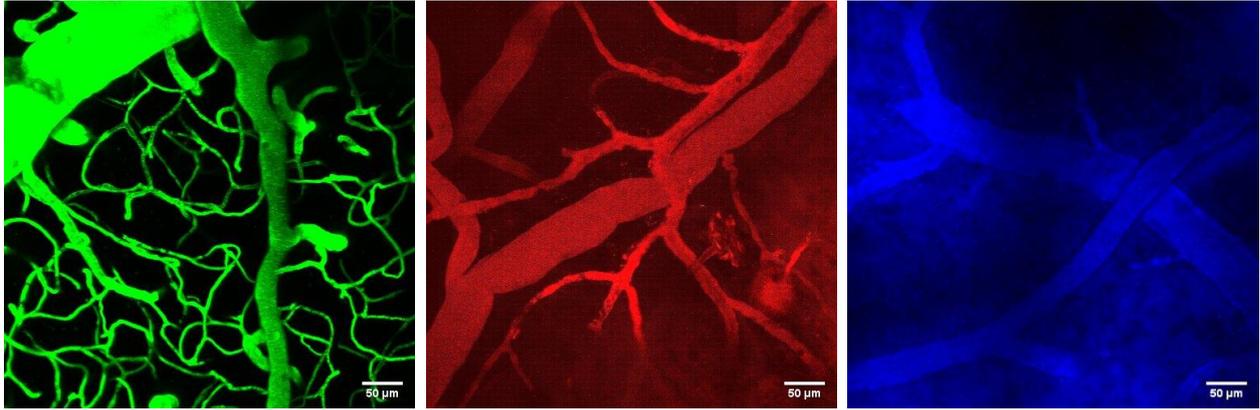


**Abbildung 25:** : Darstellung von Astrozyten (Rot, SR101) und Neuronen (Gelb, YFP) mittels *in vivo* TPLSM. Maßstabsleiste = 50  $\mu\text{m}$ .

## 8.5 Darstellung von Blutgefäßen

### 8.5.1 Vergleich der verschiedenen Fluorophore

Für die Darstellung von Blutgefäße stehen diverse intraluminale Fluorophore zur Verfügung. In unseren Untersuchungen verwendeten wir die Farbstoffe FITC-Dextran, TRITC-Dextran sowie Cascade Blue. Genauere Angaben bzgl. der Dosierung etc. sind Abschnitt 7.6.1 - 7.6.3 aufgeführt. Eine vergleichende Übersicht der drei Fluorophore ist in Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 26:** Darstellung von Blutgefäßen mit den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen mittels TPLSM. Von links nach rechts: FITC-Dextran (Grün), TRITC-Dextran (Rot) und Cascade Blue (Blau). Maßstabsleiste = 50 µm.

Für die Darstellung von TRITC-Dextran mittels TPLSM wurde eine Wellenlänge von 800 nm gewählt. Für die Darstellung von Cascade Blue in der TPLSM wurde eine Wellenlänge von 750 nm als optimal ermittelt.

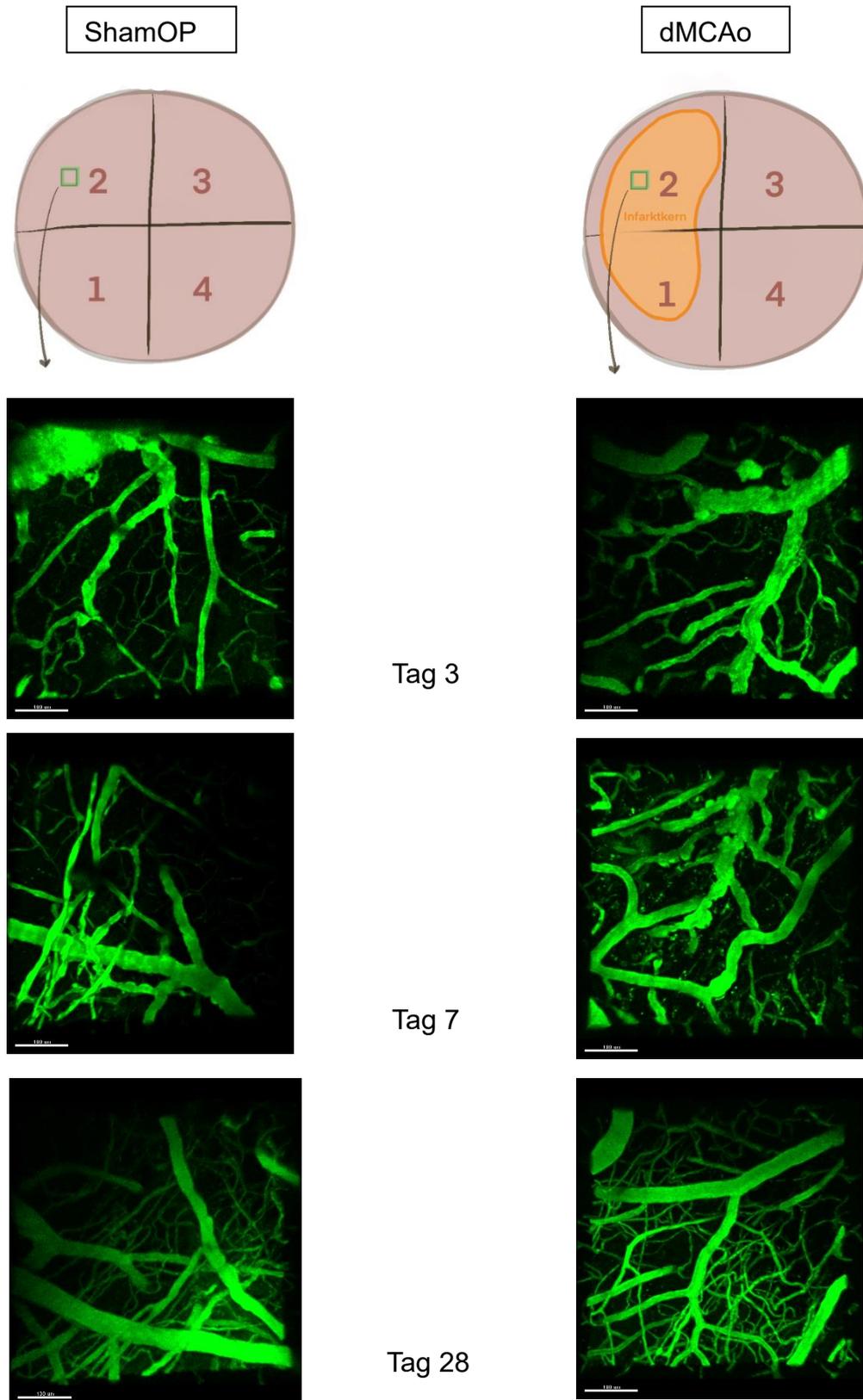
FITC-Dextran konnte mit einer Wellenlänge von 850 nm mittels TPLSM optimal dargestellt werden und erwies sich als der zuverlässigste Farbstoff für die Darstellung von Blutgefäßen. Mit diesem Fluorophor konnten auch kleine Kapillaren in der TPLSM optimal dargestellt werden. FITC-Dextran eignet sich zudem für die Darstellung von Blutgefäßen mittels IVM (vgl. Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Darstellung von Blutgefäßen mit FITC-Dextran mittels IVM an Tag 7 nach Operation des CCW. Maßstabsleiste = 0.06 mm.

### 8.5.2 Beispielhafte Darstellung einer Untersuchungsreihe

Für die erste Untersuchungsreihe wählten wir die Darstellung von Blutgefäßen mittels FITC-Dextran. In Abbildung 28 sind beispielhaft die Aufnahmen der Blutgefäße nach ShamOP bzw. nach dMCAo jeweils aus dem Quadrant 2 über den Zeitraum von 28 Tagen dargestellt.



**Abbildung 28:** Aufnahmen von Blutgefäßen (FITC) aus dem Quadrant 2 im Verlauf (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) bei der ShamOP (links) und nach dMCAo (rechts). Maßstabsleiste = 100 µm.

## 8.6 Analyse des Gefäßdurchmessers

Alle Werte der Gefäßdurchmesser wurden aufgeschlüsselt nach Aufnahmezeitpunkten und nach Quadranten zusammengetragen. Bei den Aufnahmen nach ischämischem Schlaganfall wurden die Quadranten 1 und 2 als Infarktkern und Quadranten 3 und 4 als Peri-Infarktzone definiert.

Eine Verdeutlichung der Quadranteneinteilung sowie eine Begründung der Unterscheidung in Infarktkern und Peri-Infarktzone habe wurde in Abschnitt 7.3.2.1 erläutert bzw. in Abbildung 8 dargestellt.

### 8.6.1 Vergleich von Schlaganfall und ShamOP

Für die Analyse der Gefäßdurchmesser wurde zunächst für jeden Aufnahmezeitpunkt die Häufigkeitsverteilung aller in den Quadranten 1-4 gemessenen Gefäßdurchmesser nach ShamOP bzw. nach dMCAo dargestellt.

Zunächst lässt sich festhalten, dass in beiden Versuchsgruppen mit dem Fortschreiten der Untersuchungszeitpunkte eine höhere Anzahl an Gefäßen aufgenommen werden konnte. Anhand des Histogramms ist zu erkennen, dass in der Versuchsgruppe mit dMCAo an Tag 28 deutlich mehr Gefäße mit kleinem Durchmesser ( $\leq 10\mu\text{m}$ ) aufgenommen werden konnten als bei der Mikroskopie an Tag 3. Dies ist auch in der Versuchsgruppe mit ShamOP der Fall.

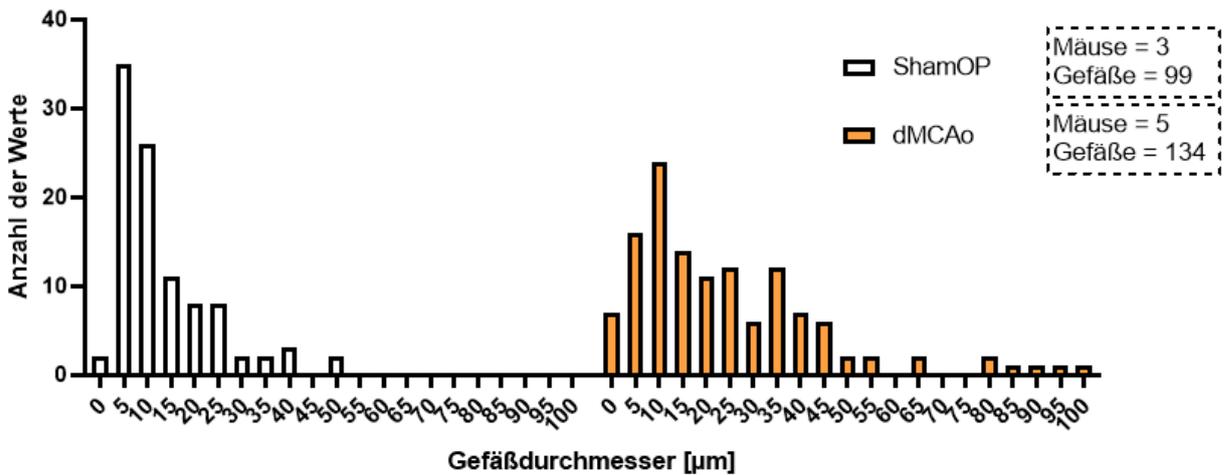
In der statistischen Analyse fällt auf, dass in der Versuchsgruppe mit dMCAo die Medianwerte der gemessenen Gefäßdurchmesser kontinuierlich sinken: Tag 3 = 17,93  $\mu\text{m}$ , Tag 7 = 10,05  $\mu\text{m}$  und Tag 28 = 7,98  $\mu\text{m}$ . In der Versuchsgruppe mit ShamOP lauten die Medianwerte: Tag 3 = 9,90  $\mu\text{m}$ , Tag 7 = 11,55  $\mu\text{m}$  und Tag 28 = 6,64  $\mu\text{m}$ . Der Median der Vergleichsgruppe mit ShamOP liegt an Tag 3 deutlich unter dem Median der Versuchsgruppe mit dMCAo. Der Median und die Häufigkeitsverteilung der Gefäßdurchmesser der beiden Versuchsgruppen näherten sich an Tag 28 an.

Die Analyse mittels unpaarigem T-Test zeigte an Tag 3 einen 4fach-signifikanten Unterschied der Gefäßdurchmesser nach ShamOP im Vergleich zu dMCAo

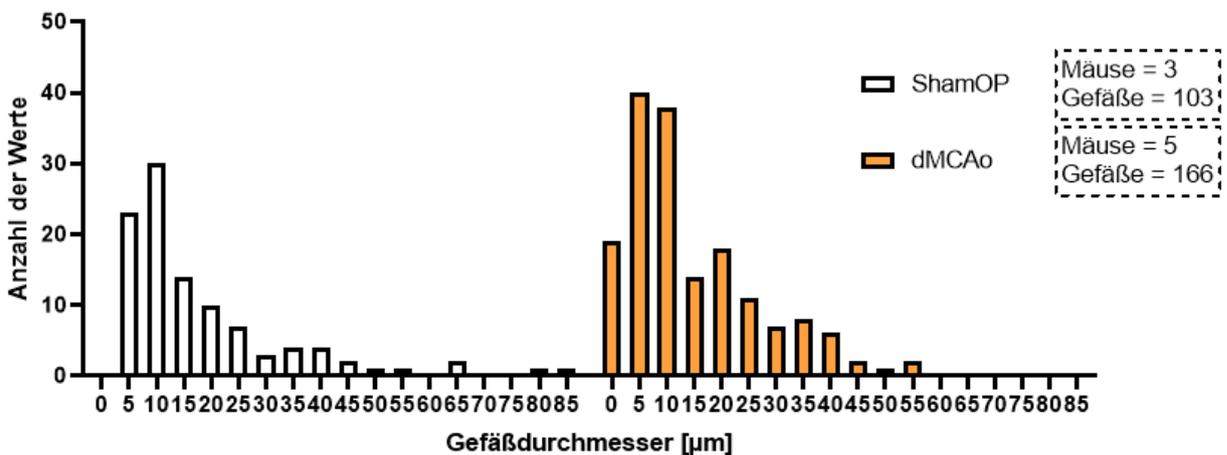
(p-Wert = <0,0001). An Tag 7 ergab sich ein einfach-signifikanter Unterschied der Gefäßdurchmesser beider Versuchsgruppen (p-Wert = 0,0424). Bei den Aufnahmen an Tag 28 ermittelten wir ebenfalls einen einfach-signifikanten Unterschied der Gefäßdurchmesser nach ShamOP im Vergleich zu dMCAo (p-Wert = 0,0151) in der statistischen Analyse.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 und Abbildung 30 dargestellt.

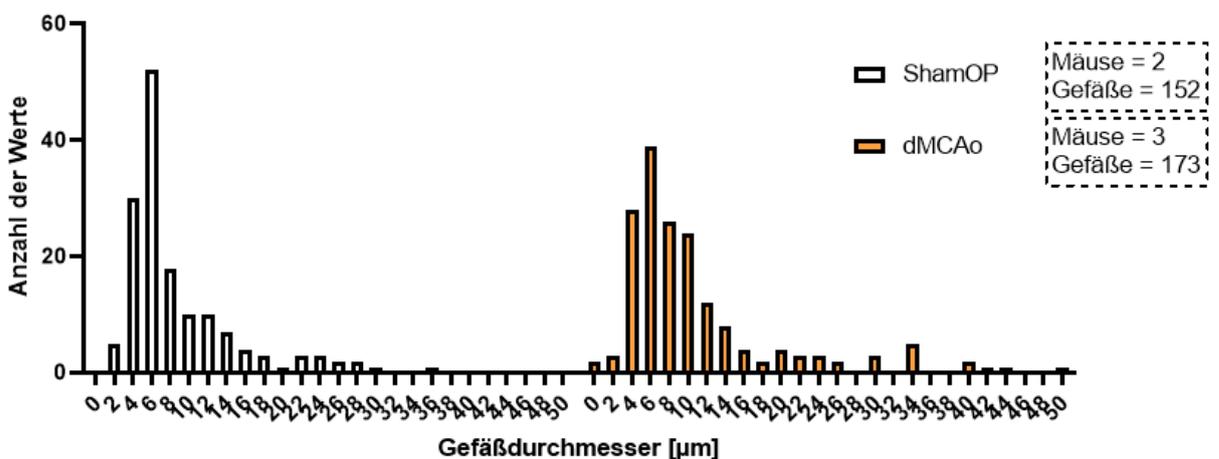
### Häufigkeitsverteilung des Gefäßdurchmessers an Tag 3 nach OP



### Häufigkeitsverteilung des Gefäßdurchmessers an Tag 7 nach OP

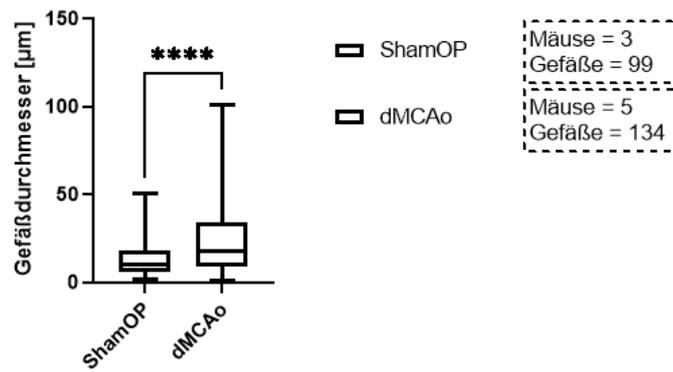


### Häufigkeitsverteilung des Gefäßdurchmessers an Tag 28 nach OP

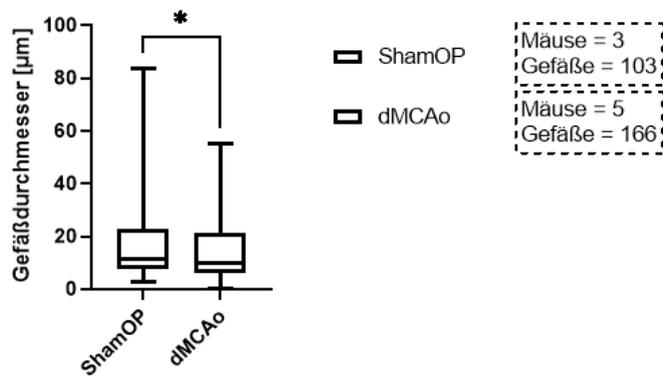


**Abbildung 29:** Vergleichende Darstellung zwischen ShamOP und dMCAo der mittels TPLSM gemessenen Gefäßdurchmesser als Häufigkeitsverteilung in Histogrammen. Von oben nach unten sind die drei Aufnahmezeitpunkte (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) dargestellt. Zu beachten sind die Skalierungen der X- und Y-Achsen, die zum Zweck der besseren Lesbarkeit sich nicht entsprechen.

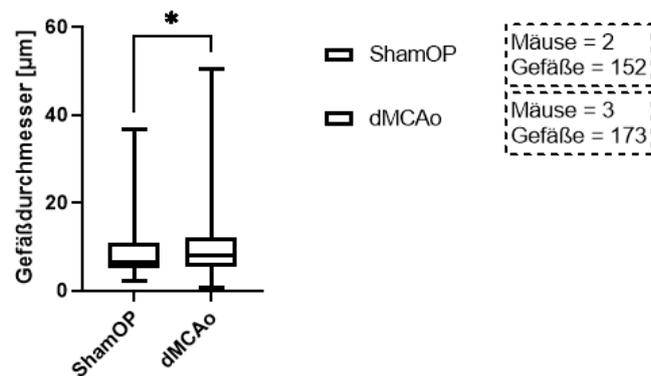
**Gefäßdurchmesser bei ShamOP vs. dMCAo an Tag 3**



**Gefäßdurchmesser bei ShamOP vs. dMCAo an Tag 7**

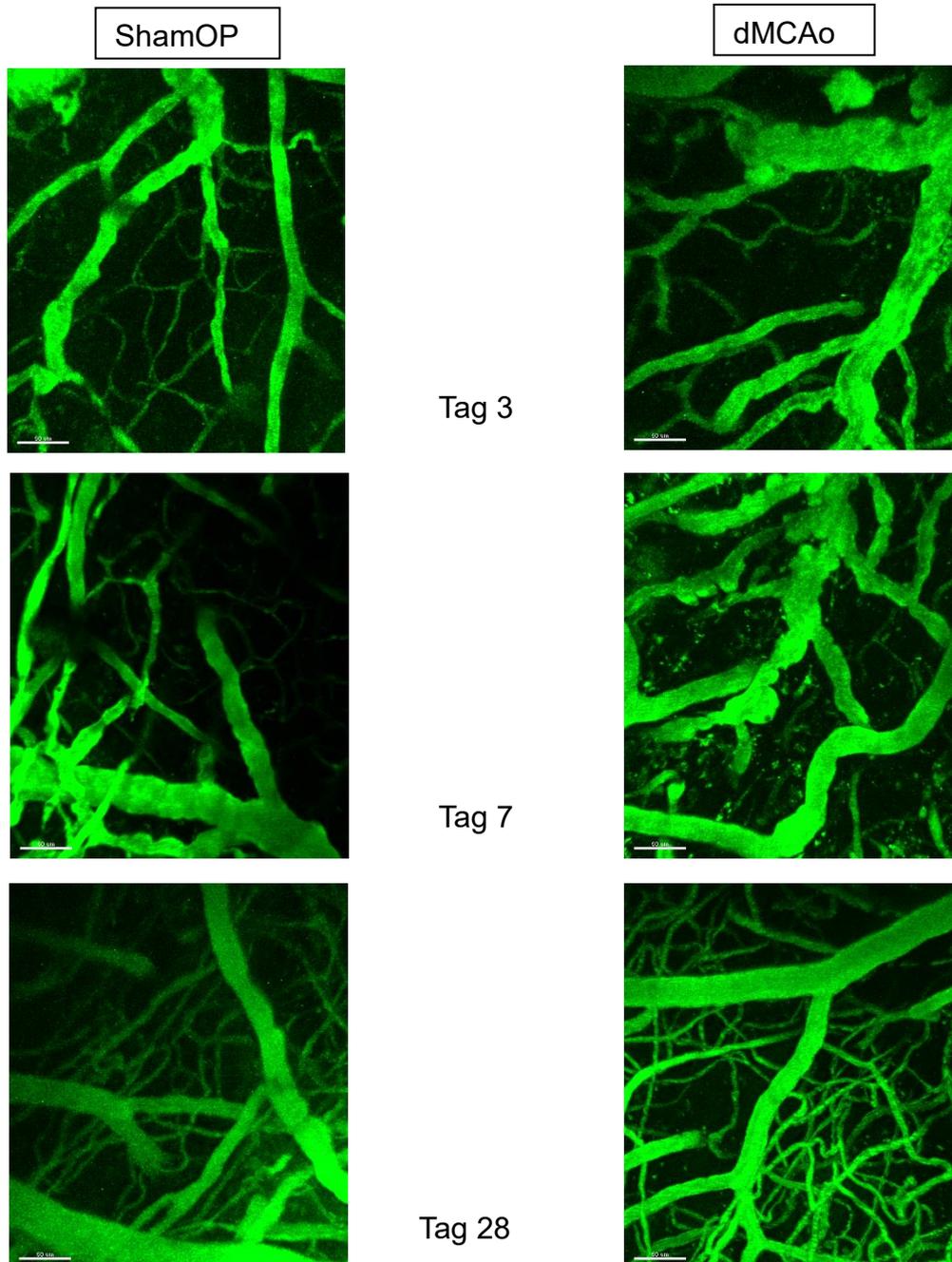


**Gefäßdurchmesser bei ShamOP vs. dMCAo an Tag 28**



**Abbildung 30:** Darstellung der statistischen Analyse des Unterschied zwischen den ermittelten Gefäßdurchmessern bei ShamOP und dMCAO mittels unpaarigem T-Test. Von oben nach unten sind die drei Aufnahmezeitpunkte (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) dargestellt.

Zusätzlich sind in Abbildung 31 vergleichend vergrößerte Bildausschnitte der Aufnahmen aus Abbildung 28 dargestellt, an denen die beschriebenen Unterschiede der Gefäßdurchmesser erkannt werden können.



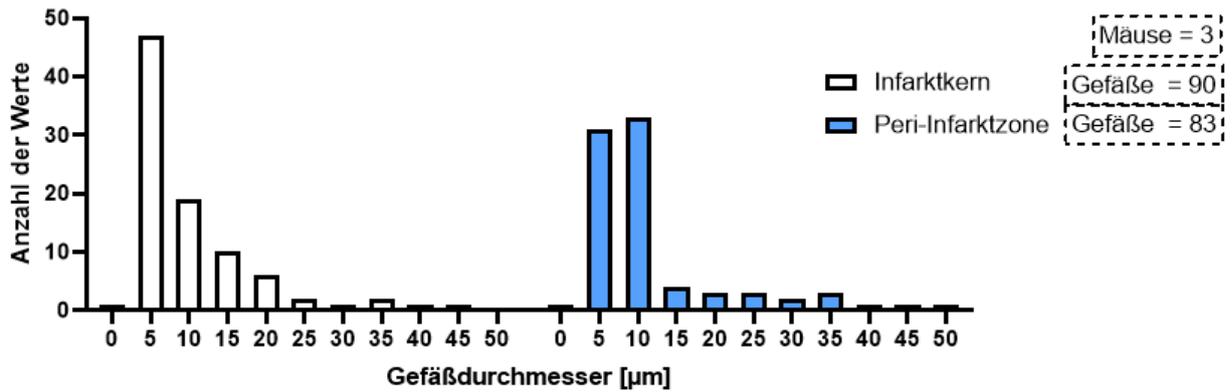
**Abbildung 31:** Vergleich der Gefäße (FITC) an den verschiedenen Aufnahmepunkten (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) mittels TPLSM im Vergleich zwischen ShamOP (links) und dMCAo (rechts). Alle Aufnahmen stammen jeweils aus Quadrant 2. Maßstabsleiste = 50 µm.

### 8.6.2 Vergleich von Infarktkern und Peri-Infarktzone

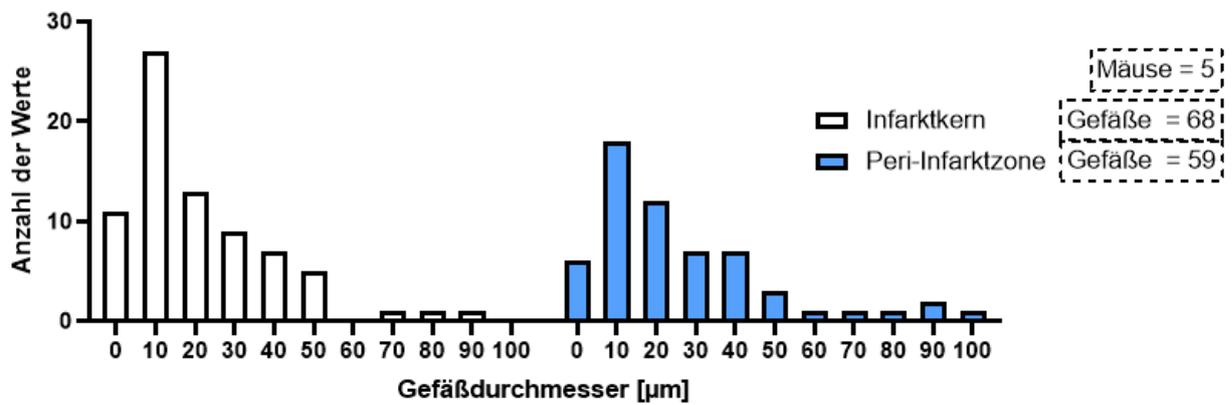
Die Auswertungen der Gefäßdurchmesser wurden anschließend innerhalb Versuchsgruppe mit dMCAo als Vergleich zwischen Blutgefäßen von innerhalb des Infarktkerns (Quadrant 1 und 2) gegenüber der Peri-Infarktzone (Quadrant 3 und 4) durchgeführt. Zuerst sind wieder die Histogramme der Verteilung der Gefäßdurchmesser und zusätzlich die Ergebnisse der statistischen Analyse mittels unpaarigem T-Test dargestellt (vgl. Abbildung 32 und Abbildung 33).

Es fällt auf, dass zu allen Untersuchungszeitpunkten der Median der Gefäßdurchmesser in dem Infarktkern einen geringeren Wert aufweist als in der Peri-Infarktzone. Die Medianwerte des Infarktkerns lauten: Tag 3 = 14,41  $\mu\text{m}$ , Tag 7 = 9,44  $\mu\text{m}$ , Tag 28 = 7,07  $\mu\text{m}$  und die der Peri-Infarktzone lauten: Tag 3 = 18,43  $\mu\text{m}$ , Tag 7 = 10,65  $\mu\text{m}$ , Tag 28 = 8,52  $\mu\text{m}$ . In der statistischen Analyse lässt sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied ermitteln.

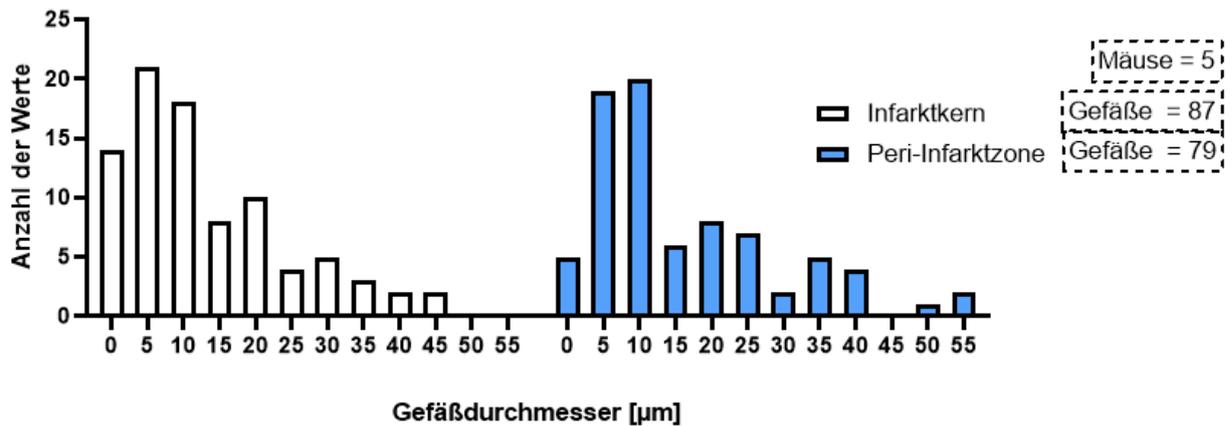
### Häufigkeitsverteilung des Gefäßdurchmessers an Tag 28 nach dMCAo



### Häufigkeitsverteilung des Gefäßdurchmessers an Tag 3 nach dMCAo

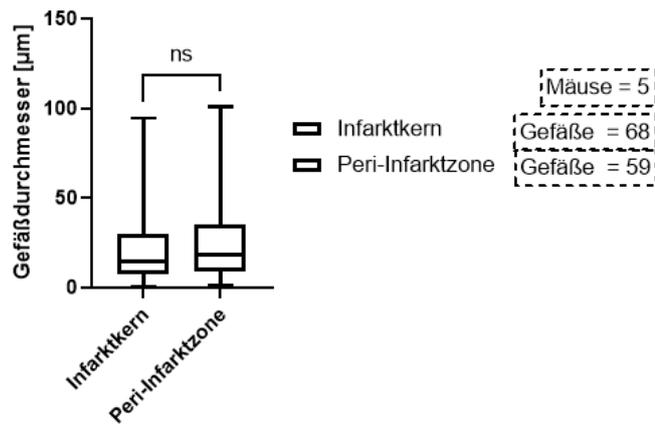


### Häufigkeitsverteilung des Gefäßdurchmessers an Tag 7 nach dMCAo

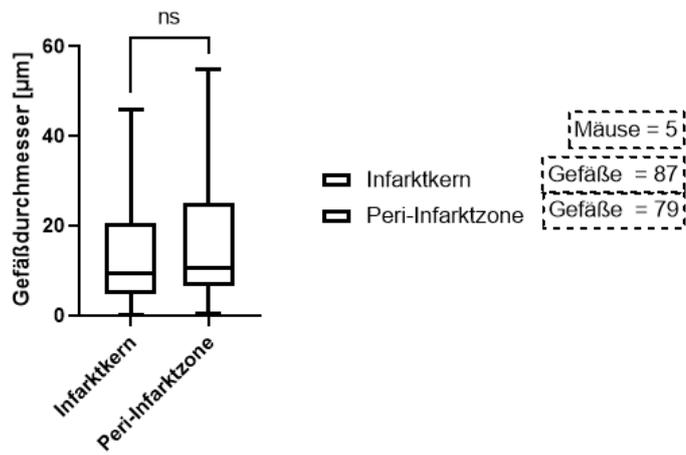


**Abbildung 32:** Vergleichende Darstellung der im Infarkt Kern und Peri-Infarktzone nach dMCAo der mittels TPLSM gemessenen Gefäßdurchmesser als Häufigkeitsverteilung in Histogrammen. Von oben nach unten sind die drei Aufnahmezeitpunkte (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) dargestellt.

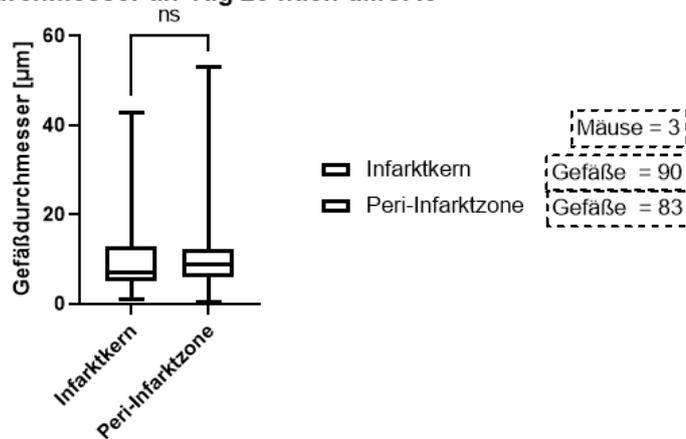
### Gefäßdurchmesser an Tag 3 nach dMCAo



### Gefäßdurchmesser an Tag 7 nach dMCAo



### Gefäßdurchmesser an Tag 28 nach dMCAo



**Abbildung 33:** Darstellung der statistischen Analyse des Unterschied zwischen den ermittelten Gefäßdurchmessern im Infarktkern und Peri-Infarktzone nach dMCAo mittels unpaarigem T-Test. Von oben nach unten sind die drei Aufnahmezeitpunkte (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) dargestellt.

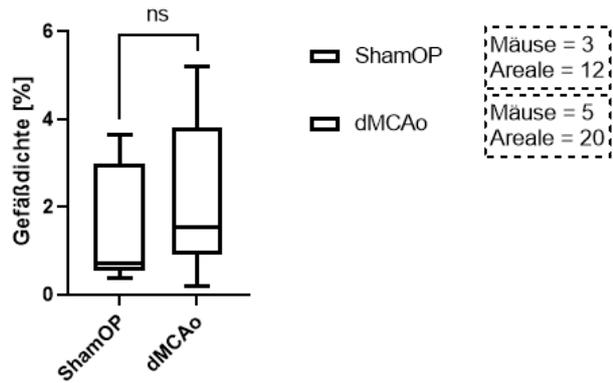
## 8.7 Analyse der Gefäßdichte

### 8.7.1 Vergleich von Schlaganfall und ShamOP

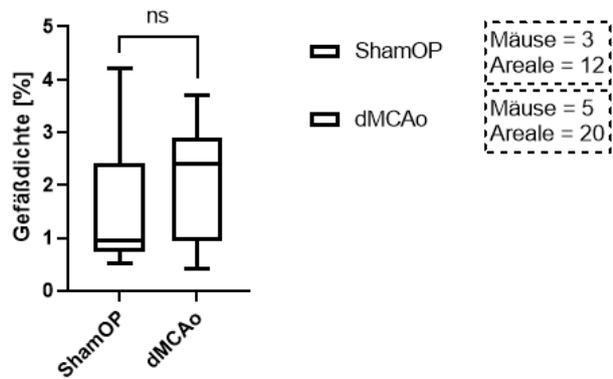
Neben dem Gefäßdurchmesser wählten wir auch die Gefäßdichte als einen Analyseparameter. Zuerst wurde wiederum die Gefäßdichte der Quadranten 1-4 der Versuchsgruppe mit dMCAo mit den Werten ebendieser Quadranten der Kontrollgruppe mit ShamOP verglichen. Es fällt auf, dass zu allen Untersuchungszeitpunkten die Medianwerte der Gefäßdichte in der Versuchsgruppe mit dMCAo (Tag 3 =  $1,52 \mu\text{m}^3$ , Tag 7 =  $2,41 \mu\text{m}^3$ , Tag 28 =  $1,48 \mu\text{m}^3$ ) über denen der Kontrollgruppe mit ShamOP (Tag 3 =  $0,72 \mu\text{m}^3$ , Tag 7 =  $0,95 \mu\text{m}^3$ , Tag 28 =  $1,41 \mu\text{m}^3$ ) liegen. Wenngleich die mediane Gefäßdichte an Tag 3 und 7 zwischen den beiden untersuchten Gruppen deutlich auseinanderliegt, fällt der Unterschied an Tag 28 nur minimal aus.

In der statistischen Analyse können die Unterschiede der Gefäßdichte nicht als signifikant bewertet werden. Die Ergebnisse der unpaarigen T-Tests zu den drei Untersuchungszeitpunkten sind in Abbildung 34 dargestellt.

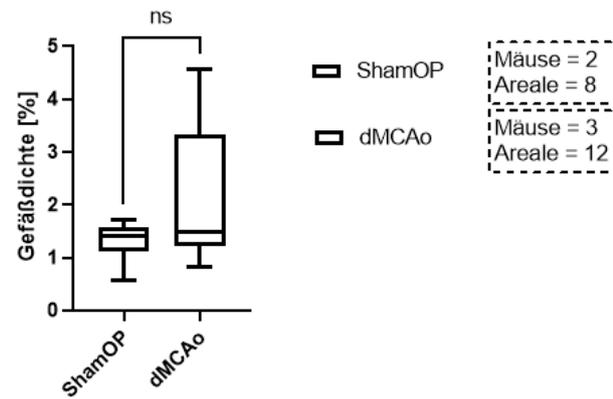
### Gefäßdichte ShamOP vs. dMCAo an Tag 3



### Gefäßdichte ShamOP vs. dMCAo an Tag 7



### Gefäßdichte ShamOP vs. dMCAo an Tag 28



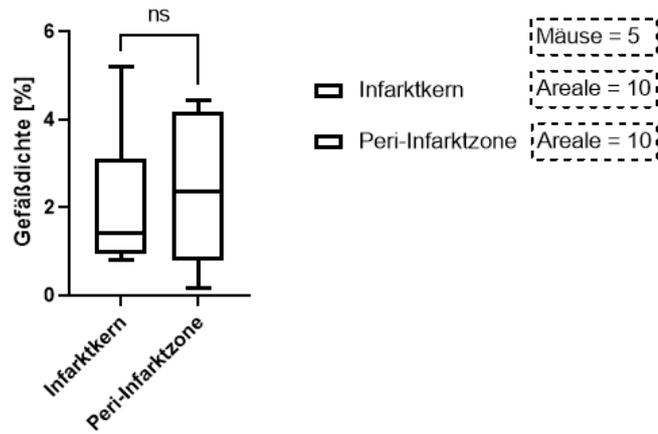
**Abbildung 34:** Statistische Analyse mittels unpaarigem T-Test der Gefäßdichte zu den jeweiligen Messzeitpunkten (Tag 3, Tag 7 und Tag 28 im Vergleich zwischen ShamOP und dMCAo).

### 8.7.2 Vergleich von Infarktkern und Peri-Infarktzone

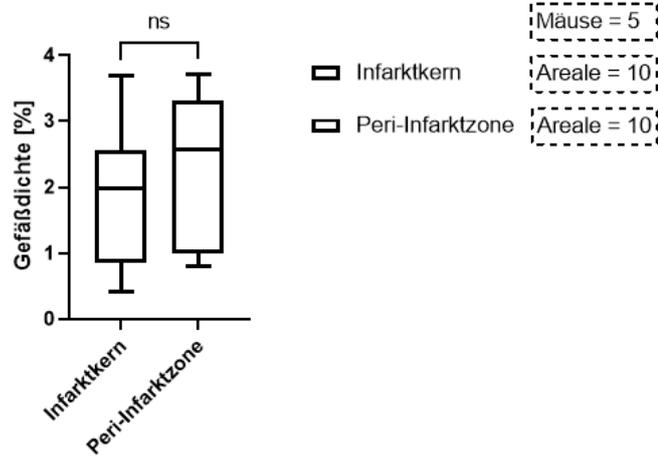
Bei dem Vergleich von Infarktkern und Peri-Infarktzone zeigt sich im Infarktkern zu den Untersuchungszeitpunkten Tag 3 und Tag 7 ein niedrigerer Wert des Medians der Gefäßdichte (Tag 3 =  $1,42 \mu\text{m}^3$ , Tag 7 =  $1,97 \mu\text{m}^3$ ) als in der Peri-Infarktzone (Tag 3 =  $2,35 \mu\text{m}^3$ , Tag 7 =  $2,57 \mu\text{m}^3$ ). An Tag 28 liegt der Median der Gefäßdichte im Infarktkern (Tag 28 =  $1,58 \mu\text{m}^3$ ) minimal über dem Median der Gefäßdichte der Peri-Infarktzone (Tag 28 =  $1,46 \mu\text{m}^3$ ).

Es ließ sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied der Gefäßdichte zwischen Infarktkern und Peri-Infarktzone zu erkennen. Die Ergebnisse der unpaarigen T-Tests zu den drei Untersuchungszeitpunkten sind in Abbildung 35 dargestellt.

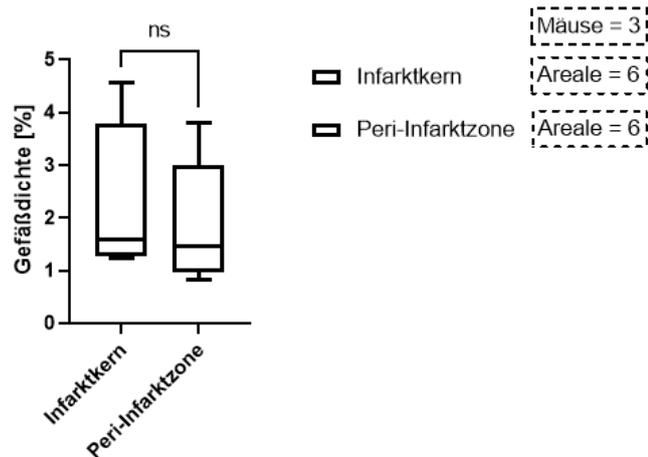
### Gefäßdichte an Tag 3 nach dMCAo



### Gefäßdichte an Tag 7 nach dMCAo



### Gefäßdichte an Tag 28 nach dMCAo



**Abbildung 35:** Statistische Analyse mittels unpaarigem T-Test der Gefäßdichte zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten (Tag 3, Tag 7 und Tag 28) und der Vergleich zwischen Infarktcore und Peri-Infarktzone.

## 9 DISKUSSION

### 9.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vivo* Aufnahme der NVU mittels TPLSM zur Untersuchung von Veränderungen nach ischämischem Schlaganfall etabliert. Es wurden zudem Ergebnisse in Bezug auf gefäßmorphologische Veränderungen anhand der Parameter *Gefäßdurchmesser* und *Gefäßdichte* generiert. Meine Arbeit ermöglicht es, in unserem Labor die systematischen *in vivo* Untersuchungen der NVU nach ischämischem Schlaganfall mittels TPLSM fortzusetzen. Außerdem können andere Projekte, die die TPLSM einsetzen möchten, von den hier geschilderten Erkenntnissen profitieren.

### 9.2 Diskussion der Methoden

#### 9.2.1 Chronisch kraniales Fenster

In der Literatur sind diverse Modelle eines CCW für die *in vivo* Untersuchung des Kortex mittels TPLSM beschrieben. Eine häufig diskutierte Fragestellung ist, ob es zu besseren Ergebnissen führe, die Schädelkalotte auszudünnen, genannt *thinned-skull* (dt. ausgedünnter Schädel) oder – wie in unseren Untersuchungen – eine Osteotomie mit anschließendem Verschluss des Schädelfensters mit z.B. einem gläsernen Deckglas, genannt *open-skull* (dt. offener Schädel), durchzuführen. Als Vorteil der *thinned-skull*-Methode werden die geringe Invasivität sowie die reduzierte Neuroinflammation angeführt (Yang et al., 2010). Im direkten Vergleich der beiden Techniken zeigten sich jedoch diverse Nachteile der *thinned-skull*-Methode gegenüber der *open-skull*-Methode: Die Fläche, die mit dem Mikroskop aufgenommen werden kann, sei kleiner, die Tiefe, bis zu der gemessen werden könne, geringer und die Brechung des Lichts an der Grenzschicht von Schädelknochen und umliegenden Gewebe würde zu einer schlechteren Abbildung der zu untersuchenden Strukturen führen (Isshiki and Okabe, 2014).

Bei der Operation des CCW mittels Osteotomie ist es wichtig, die Dura mater an der Stelle der Kraniotomie nicht zu entfernen, da sie bei den Untersuchungen mittels TPLSM eine

wertvolle Orientierungshilfe darstellt (vgl. 7.5.1). Zudem reduziert sich die durch die Operation induzierte Inflammation deutlich, wenn nicht in das intrakranielle Drucksystem eingegriffen und das Gehirn nicht mit Luft in Kontakt gebracht wird (Shih et al., 2012).

Eine Verbesserungsmöglichkeit unserer Methode, die bei dem von uns gewählten Versuchsaufbau nicht implementiert werden konnte, wäre eine Verbindung zwischen dem CCW und dem Objektiv des Mikroskops, d.h. eine Möglichkeit der Kopfhaltung. Dadurch könnte dauerhaft der gleiche Bildausschnitt sowie Blickwinkel auf das zu untersuchende Feld sichergestellt werden und die Vergleichbarkeit der longitudinal generierten Aufnahmen verbessert werden.

Eine derartige Konstruktion könnte z.B. die Kombination aus einem speziell modifizierten Titanring mit einer metallenen Fixierungsstation sein, wie sie von Hefendehl et al. beschrieben wurde (Hefendehl et al., 2012). Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung eines Schraubenmutter / Schraub-Systems (Shih et al., 2012). Zudem sind bereits entsprechende Versuchsaufbauten veröffentlicht worden, bei denen die Maus während des Mikroskopievorgangs wach ist – mit dem Vorteil, dass ein möglicher Einfluss der Narkose auf das Blutgefäßsystem eliminiert werden kann (Li et al., 2020).

Erwähnen möchte ich außerdem eine Aufnahmemethode, die mit der Entwicklung von spezialisierten Linsen, sog. *Gradientenindex-Linsen*, möglich wurde. Gradientenindex-Linsen verändern durch spezielle Materialeigenschaften die Brennweite so, dass in deutlich tiefer liegenden Gewebsschichten an lebenden Organismen Aufnahmen generiert werden können. Dieses auch als *Endomikroskopie* bezeichnete Forschungsfeld ermöglicht es z.B. mehrere Millimeter tief gelegene Strukturen des Gehirns, wie beispielweise die Pyramidenzellen aus der CA1-Region des Hippocampus, aufzunehmen (Meng et al., 2019). Auch die in der Einleitung erwähnten *in vivo* Aufnahmen des Knochenmarks werden durch den Einsatz von Gradientenindex-Linsen ermöglicht (Reismann et al., 2017, Stefanowski et al., 2020).

Mit der in unseren Untersuchungen verwendeten Methode des CCW erzielten wir gute Ergebnisse. Für die Zukunft können die aufgeführten Anregungen jedoch genutzt werden, um die Methode weiter zu verbessern.

### 9.2.2 Distale Okklusion der A. cerebri media

Um einen Schlaganfall im Tiermodell zu simulieren, sind verschiedene Methoden bekannt. Wie in allen tierexperimentellen Modellen muss die Frage nach der Vergleichbarkeit mit humanen Prozessen gestellt werden. Die dMCAo stellt eine chirurgische Herausforderung dar, sticht jedoch durch die visuelle Kontrolle der erfolgten Okklusion und die gute Reproduzierbarkeit der Infarktgröße hervor (Fluri et al., 2015). Zudem ist die Dauer Operation mit ca. 20 Minuten im Vergleich zu anderen Methoden gering (Llovera et al., 2014). Positiv in Bezug auf die Vergleichbarkeit ist zu nennen, dass dieses Modell die durchschnittliche Größe des Infarktkerns bei humanen Patientinnen und Patienten realistischer als andere bekannte Modelle nachbildet (Carmichael, 2005).

Ein weiteres, häufig verwendetes tierexperimentelles Modell ist die proximale Okklusion der MCA. In diesem Modell wird ein mit Silikon beschichteter Faden in das Lumen der A. carotis interna eingeführt, vorgeschoben und der Abgang der MCA für meist 30-120 Minuten transient blockiert (Chiang et al., 2011). Bei erfolgreicher Durchführung zeigt sich ein ausgedehnter Schlaganfall, der neben dem Cortex auch den Thalamus, Hippocampus und die Substantia nigra betrifft (Canazza et al., 2014). Für die *in vivo* TPLSM ist jedoch von Nachteil, dass sich die Infarktzone – im Vergleich zu der dMCAo – weniger weit in die Peripherie ausbreitet (Fluri et al., 2015). Für die Mikroskopie kann die proximale Okklusion der MCA somit von Nachteil sein, da die Infarktzone eventuell nicht mit dem in der Eindringtiefe begrenzten Mikroskop erfasst werden kann.

Insgesamt muss man festhalten, dass jedes bisher bekannte Tiermodell Limitationen aufweist und sich neuroprotektive Behandlungstherapien, die an bekannten Tiermodellen des ischämischen Schlaganfalls Wirkung gezeigt haben, bisher kaum auf die Behandlung von Menschen anwenden lassen (Sommer, 2017).

In einem Review aus dem Jahr 2006 nennt U. Dirnagl als Limitationen des Tiermodells z.B., dass Behandlungsergebnisse von jungen, gesunden Mäusen nicht ohne Weiteres auf ältere, komorbide Patientinnen und Patienten übertragen werden können oder dass die Dosis eines Medikaments, welches am Tiermodell zum Einsatz kommt, bei einem Menschen aufgrund der toxischen Nebenwirkungen nicht gegeben werden kann. Er äußert sich jedoch auch kritisch über die Ergebnisse einiger Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler, die ihre eigenen Ergebnisse aufgrund z.B. von falschen statistischen

Berechnungen, als zu relevant einschätzen und lädt zu einer Diskussion über ebensolche qualitativen Mängel in der Forschung ein (Dirnagl, 2006).

Dies sollte uns aber nicht von der weiteren Grundlagenforschung zu den Mechanismen sowie der Therapie des ischämischen Schlaganfalls abhalten.

### 9.2.3 Fluoreszenzfarbstoffe

#### 9.2.3.1 YFP zur Darstellung von Neuronen

Die genetische Fluoreszenzmarkierung der Neurone ermöglichte zuverlässig deren Aufnahme mittels TPLSM. In Bezug auf eine mögliche Quantifizierung besteht beispielsweise die Möglichkeit, Veränderungen der dendritischen Spines zu analysieren, wofür Beispiele bei anderen Forschungsgruppen gefunden werden können (Brown et al., 2007). Da aber bisher unser Fokus noch nicht auf der Untersuchung von dendritischen Fortsätzen gelegen hat, führten wir diese Analysen nicht durch.

#### 9.2.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe zur Darstellung von Blutgefäßen

Die intravenöse, retroorbitale Injektion der Farbstoffe FITC-Dextran, TRITC-Dextran oder Cascade Blue zur Markierung von Blutgefäßen hat problemlos funktioniert. Für die Darstellung von Kapillaren eignet sich aus unserer Erfahrung am besten die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs FITC-Dextran.

Bei den genannten Fluoreszenzfarbstoffen zur Darstellung von Blutgefäßen handelte es sich stets um ein an eine Dextran gekoppeltes Fluorophor. Durch die entsprechende Auswahl im Einkauf, konnten wir die Größe des Dextrans und damit das molekulare Gewicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zur Darstellung von Blutgefäßen verändern. Dies ist wichtig zu beachten, da z.B. die Applikation von Cascade Blue mit einem MW von 10 000 Da in den ersten Tagen nach dem ischämischen Schlaganfall zu einer Extravasation des Farbstoffs führen kann. Dies ist ein Grund, weshalb sich Kapillaren in diesem Zeitraum mit dem Farbstoff Cascade Blue kaum darstellen lassen.

### 9.2.3.3 SR101 zur Darstellung von Astrozyten

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag in der Etablierung eines geeigneten Ablaufs zur Darstellung von Astrozyten innerhalb der NVU. Die Einschränkungen bei der Verwendung des Farbstoffs SR101 zur *in vivo* Markierung von Astrozyten nach ischämischem Schlaganfall werden daher im Folgenden noch einmal besonders ausführlich diskutiert.

In der Literatur wurde die Verwendung von SR101 zur *in vivo* Darstellung von Astrozyten bereits beschrieben, jedoch nicht nach ischämischen Schlaganfall. Es wurden allerdings Beobachtungen veröffentlicht, die Herausforderungen bei der Anwendung von SR101 nach ischämischen Schlaganfall vermuten ließen.

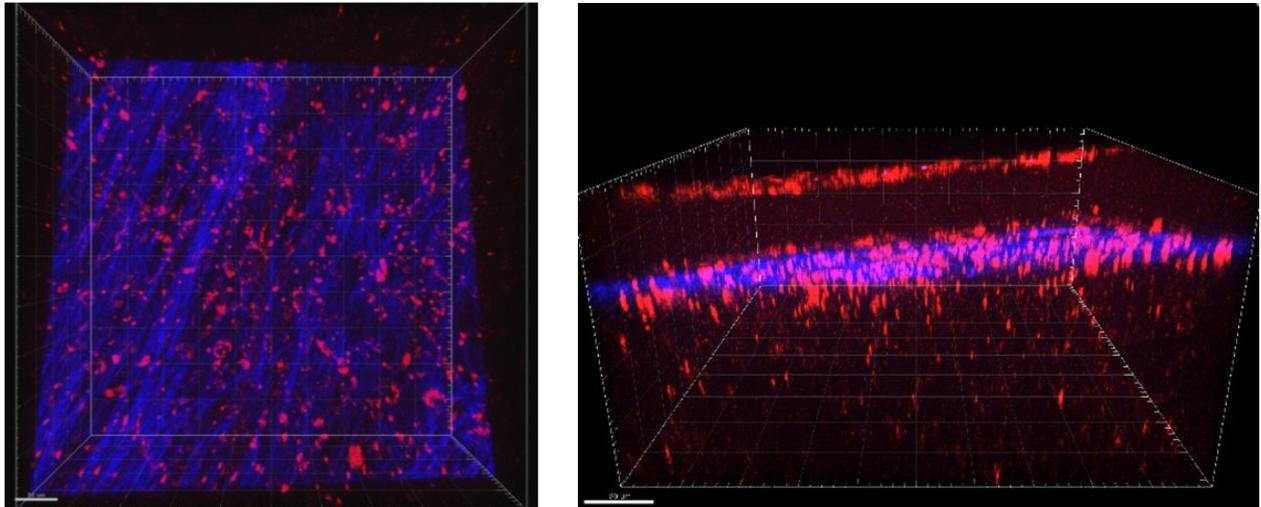
An Hirnschnitten, deren Versorgung mit Sauerstoff und Glukose reduziert wurde, wurde von einer Öffnung der Hemichannels aufgrund der hypoxischen Bedingungen und einer Ausbreitung von SR101 ebenfalls in die Zellkörper der Neurone berichtet (Thompson et al., 2006).

Die Frage, ob SR101 auch reaktive Astrozyten färbt, noch nicht beantwortet. Grund zum Zweifeln stellt die Beobachtung dar, dass die Gap Junctions der Astrozyten im Fall der Ischämie aufgrund der pH-Wert Verschiebungen verschließen und so Austausch des Farbstoffs behindert sein kann (Xu et al., 2010). Als die zwei größten Unsicherheiten wurden in einer zusammenfassenden Veröffentlichung aus dem Jahr 2017 zum ersten die Unsicherheit in der Spezifität von SR101 für die Färbung von Astrozyten und zum zweiten das Risiko von unerwünschten exzitatorischen Nebenwirkungen, wie beispielsweise Veränderungen der synaptischen Plastizität, durch die Gabe von SR101 benannt (Hulsmann et al., 2017).

In unseren Untersuchungen war eine Kolo-kalisation von GFAP-GFP-positiven Astrozyten und SR101-positiven Zellen an Tag 3 nach ischämischen Schlaganfall deutlich erkennbar (vgl. Abschnitt 7.6.1.2). Wir gehen daher davon aus, dass sich SR101 für die Darstellung von Astrozyten nach ischämischen Schlaganfall eignet.

Einschränkend muss man jedoch sagen, dass sich unsere Methode nicht für die longitudinale Applikation eignet. An Tag 7, d.h. vier Tage nach der intrakortikalen Applikation von SR101, konnten keine SR101-positiven Zellen mehr beobachtet werden und auch eine erneute Applikation führte nicht zu den gewünschten Ergebnissen.

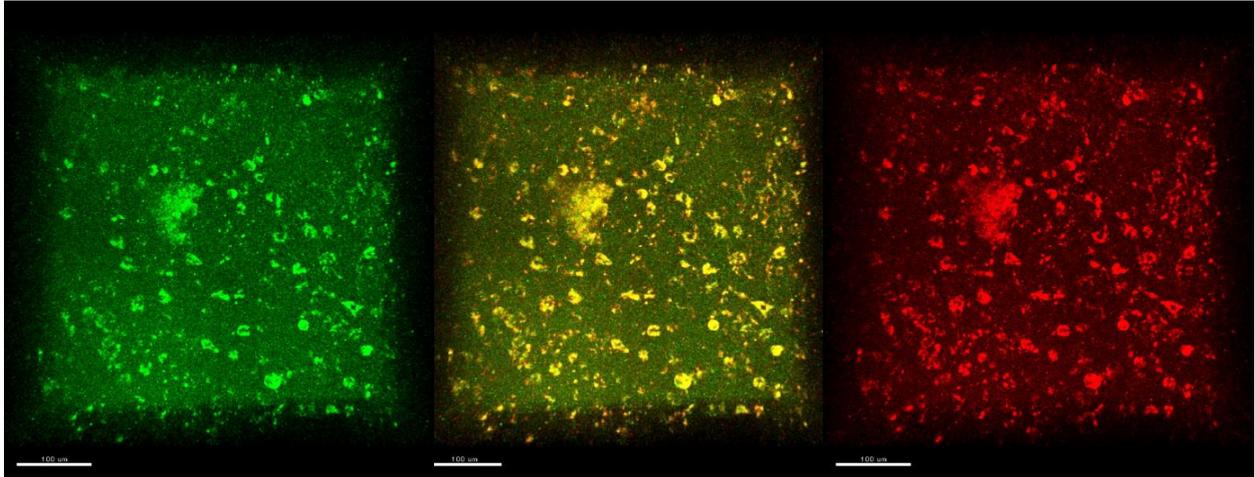
Vereinzelt sammelte sich SR101 in den Tagen nach der Applikation zudem in Zellen an, bei denen es sich um eine Population handelte, welche den Farbstoff mit einem anderen Fluoreszenzmuster aufnahm und aber oberhalb der Dura mater lag (vgl. Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Aufnahmen mittels TPLSM von Astrozyten (SR101, rot) und der Dura mater (SHG, blau). Links aus der Draufsicht (Maßstableiste = 50  $\mu\text{m}$ ) und rechts in der sagittalen Ansicht (Maßstableiste = 80  $\mu\text{m}$ ). Es eine diskrete Gruppierung von SR101-positiven Zellen oberhalb der Dura mater zu erkennen.

Zu Beginn waren wir uns dieser Tatsache nicht bewusst, weshalb wir für zukünftige Messungen dringend empfehlen, vor jeder Messung, auch das Phänomen SHG (vgl. 7.5.1) zu nutzen, um zu identifizieren, ob sich der Aufnahmebereich über- oder unterhalb der Dura mater befindet.

Die Zellpopulation oberhalb der Dura mater zeigte wie bereits erwähnt ein auffälliges Fluoreszenzmuster. Während die Astrozyten, welche unterhalb der Dura mater lagen, lediglich im PTM der Wellenlänge 593 nm (rot) zu detektieren waren, erschien das Signal der unbekanntes Zellpopulation in den Kanälen der PMTs 525 nm (grün) und 593 nm (rot). Bei zeitgleicher Darstellung der beiden Kanäle erschienen die Zellen gelb (vgl. Abbildung 37).



**Abbildung 37:** Fluoreszenzmuster der unbekanntes Zellpopulation nach intrakortikaler Applikation von SR101 in Aufnahmen mittels TPLSM. Sie konnte sowohl im PMT 525 (links, Grün), als auch im PMT 593 (rechts, rot) detektiert werden. Bei der Darstellung beider Kanäle erscheinen die Zellen Gelb (mittig). Der Aufnahmezeitpunkt ist Tag 7 nach dMCAo. An Tag 3 wurde einmalig intrakortikal SR101 injiziert. Maßstabsleiste = 100 µm.

Unsere Vermutung ist, dass es sich um Zellen handelt, die unspezifisch Farbstoffe aufnehmen, unabhängig von der Untersuchungsmethode. Aufgrund dieser Charakteristika und auch der beschriebenen morphologischen Eigenschaften, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es sich doch um eine Art von Immunzellen handelt, welche den Fluoreszenzfarbstoff als Fremdstoff erkennen und aufnehmen.

Das Phänomen konnten wir in Zusammenhang mit SR101 in keiner Publikation finden.

#### 9.2.4 Intravital-Epifluoreszenz-Videomikroskopie

Wie bereits erwähnt verwendeten wir die IVM in unseren Untersuchungen für die Validierung der Operationsmethoden CCW und dMCAo und außerdem für die Darstellung von Blutgefäßen mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran. Die IVM kann auch für die Darstellung von anderen Fluorophoren, passend zu den Parametern des Filterblocks genutzt werden.

Ein anderes Beispiel für die Nutzung der IVM ist die Darstellung von weißen Blutzellen mit dem Fluorophor Rhodamine 6G, wie es eine Arbeitsgruppe um Dr. Simon Bayerl in unserem Forschungslabor bereits durchführte (Bayerl et al., 2016b).

Der Aufbau der IVM nimmt nur verhältnismäßig wenig Platz in Anspruch. Aus diesem Grund konnte das Mikroskop für unsere Untersuchungen direkt neben dem Operationssaal in einem abgedunkelten Raum platziert werden.

Ein weiterer Vorteil liegt in der leichten Handhabung der IVM. Im Vergleich zur TPLSM ist eine Einarbeitung in die IVM als eine Methode der *in vivo* Mikroskopie unserer Erfahrung nach zügig möglich. Diese Methode kann somit auch für kleinere Projekte mit einem begrenzten Zeitumfang genutzt werden. Sie empfiehlt sich zudem um ein Verständnis der physikalischen Grundlagen in Vorbereitung auf Untersuchungen mittels TPLSM aufzubauen.

Im Hinblick auf mögliche Limitationen der IVM sind zwei Dinge entscheidend: Zum einen können durch die Verwendung des Filterblocks nicht zwei oder mehr Fluorophore gleichzeitig detektiert werden. Der Filterblock muss stets zu dem verwendeten Fluorophor passend gewählt und kann nicht zeitgleich mit einem zweiten Filterblock genutzt werden.

Zum anderen ist die Auswertung der mittels IVM generierten Daten in unserem Labor derzeit nur begrenzt möglich. Die Aufnahmen werden auf VHS-Videokassette gespeichert, welche im Anschluss mit einem Analyseprogramm ausgewertet werden können. Die Möglichkeiten sind, vor allem im Vergleich zu den unzähligen Programmen für die Auswertung von Dateien, welche mittels TPLSM generiert wurden, begrenzt.

### 9.2.5 Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie

Die TPLSM wird oft mit der CLSM verglichen. Bei der CLSM werden ebenso Fluoreszenzfarbstoffe – allerdings mit lediglich einem einzelnen Photon – zur Anregung gebracht und deren Emission detektiert. Ein Nachteil ist, dass mittels CLSM im Vergleich zur TPLSM ein volumenmäßig großer Teil der zu untersuchenden Probe außerhalb der Fokusebene angeregt wird, wodurch das räumliche Auflösungsvermögen sinkt. Die Phototoxizität ist bei der CLSM zudem höher. Aus diesem Grund und aufgrund der geringen Eindringtiefe kann die CLSM kaum am lebenden Organismus angewandt werden.

Bei der TPLSM wird die Exzitation lediglich in einem volumenmäßig sehr kleinen Bereich erreicht, da für diesen Effekt das quasi gleichzeitige Zusammentreffen von zwei Photonen

an einem definierten Punkt notwendig ist. Auf diese Weise erhöht sich die räumliche Auflösung und die Phototoxizität wird deutlich reduziert.

Ein weiterer Vorteil der Tatsache, dass die für die Anregung erforderliche Energie auf zwei Photonen aufgeteilt wird, ist, dass sich die Wellenlänge der einzelnen Photonen verdoppelt bzw. die Frequenz halbiert. Hierdurch kann eine höhere Eindringtiefe erreicht werden. Für das Gehirn der Maus werden Werte von bis zu 800-1000  $\mu\text{m}$  angegeben (Osswald and Winkler, 2013). Die TPLSM stellt einen entscheidenden Fortschritt in der tierexperimentellen Forschung dar, da sie für die Messung an lebenden Organismen gut geeignet ist und konsekutive Messungen an dem gleichen Versuchstier ermöglicht.

Bei der Untersuchung von (patho)physiologischen Vorgängen des Gehirns hat die Verwendung der TPLSM einen hohen Stellenwert in der aktuellen Forschung eingenommen. Durch die *post mortem* Untersuchungen wie z.B. die Immunfluoreszenz konnte man einzelne Zellpopulationen zwar gut charakterisieren, jedoch gelangen Aufnahmen von der Interaktion von Zellen und deren Migration erst mit der Entwicklung der TPLSM (Zhang and Murphy, 2007). Die TPLSM hat als Methode zur Untersuchungen von einzelnen Zellen in ihrer intakten, lebenden Umgebung, wesentlichen Einfluss auf den wissenschaftlichen Fortschritt genommen, besonders in den Bereichen Neurowissenschaften, Immunologie und in der Krebsforschung (Zhang and Murphy, 2007).

Mittlerweile wurden zudem verschiedene Ergänzungen der TPLSM entwickelt. Beispielweise kann die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie der Redoxcoenzyme NADH und NADPH eingesetzt werden, um Informationen über den Stoffwechsel von Zellen zu erlangen (Niesner et al., 2008).

Eine weitere Entwicklung ist die Kombination von TPLSM mit dem bildgebenden Verfahren der optischen Kohärenztomographie zur verbesserten Darstellung von morphologischen Eigenschaften des Gewebes (Rakhymzhan et al., 2020).

Für die Zukunft ist außerdem die Weiterentwicklung und breitere Anwendung der Drei-Photonen-Mikroskopie zu erwarten, mit der noch tiefer liegende Schichten des Gehirns aufgenommen werden können (Horton et al., 2013).

## 9.3 Diskussion der Ergebnisse

### 9.3.1 Analyse von Gefäßdurchmesser und Gefäßdichte

In den hier vorliegenden Analysen wurde die Gefäßstruktur nach ischämischem Schlaganfall anhand der Parameter *Gefäßdurchmesser* und *Gefäßdichte* über einen Zeitraum von 28 Tagen analysiert. In unseren Untersuchungen zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Gefäßdurchmessers an Tag 3 nach dMCAo. Diese kann als Vasodilatation interpretiert werden. Zudem deutete sich eine erhöhte Neubildung von Blutgefäßen an Tag 7 und eine weitgehende Rehabilitation des Blutgefäßsystems an Tag 28 nach dMCAo an. Kein signifikanter Unterschied konnte hingegen innerhalb des Schlaganfallbereichs, d.h. zwischen Infarktkern und Peri-Infarktzone, hinsichtlich der genannten Parameter detektiert werden.

### 9.3.2 Vergleich von Infarktkern und Peri-Infarktzone

Der Vergleich zwischen den Veränderungen der Blutgefäße des Infarktkerns gegenüber der Peri-Infarktzone soll nun diskutiert werden.

In einem Review aus dem Jahr 2019 wurde eine verstärkte Angiogenese in der Peri-Infarktzone an Tag 3 bis 7 nach ischämischem Schlaganfall beschrieben und zudem, aufgrund des zeitgleichen axonalen Wachstums sowie der Proliferation, Migration und Reifung von neuronalen Stammzellen, eine funktionelle Verbesserung des Gewebes vermutet (Hatakeyama et al., 2020).

Den Zusammenhang von erhöhter Angiogenese in der Peri-Infarktzone und verbessertem funktionellen Outcome nach ischämischem Schlaganfall bestätigten Williamson et al. ein Jahr später mit umfangreichen *in vivo* Untersuchungen. Zusätzlich zu den morphologischen Untersuchungen wurden in dieser Publikation die Flussgeschwindigkeiten der parenchymalen Blutgefäßen der Peri-Infarktzone über den Zeitraum von 28 Tagen untersucht. Zunächst sank die Flussgeschwindigkeit innerhalb stark ab, nach einer leichten Hyperämie an Tag 14 konnte jedoch an Tag 28 die Rückkehr der Flussgeschwindigkeit annähernd auf das Ausgangsniveau beobachtet werden (Williamson et al., 2020).

In unseren Untersuchungen waren die Veränderungen zwischen dem Infarktkern und der Peri-Infarktzone weder in Bezug auf den Gefäßdurchmesser noch in Bezug auf die Gefäßdichte signifikant.

Die Differenzierung von dem Infarktkern und dem Peri-Infarktzone ist nicht trivial. Die Abgrenzung der beiden Areale trafen wir, wie in 7.3.2.1 beschreiben, durch den optischen Eindruck des Aufnahmeareals sowie aufgrund der Gefäßanatomie. Um diese Einteilung zuverlässiger vorzunehmen, können in zukünftigen Experimente andere Methoden in Betracht gezogen werden.

Eine Forschergruppe um Williamson et al. nutze für Abgrenzung des Infarktkerns die *Laser-Speckle-Photometrie*, mithilfe derer die Blutflussgeschwindigkeit gemessen und Werte unterhalb eines festgelegten Grenzwertes (z.B. < 20% im Vergleich zu einem prä-Infarkt gemessenen Werts) dem Infarktkern zugeordnet werden können. Weiterhin beschrieben die Autorinnen und Autoren das Phänomen der Autofluoreszenz bei Messungen mit dem TPLSM in dem Infarktkern. (Williamson et al., 2020).

Eine andere Möglichkeit ist es, mit Hilfe von speziellen Magnetresonanztomographie-Sequenzen, sog. *Diffusions-Messungen*, auch genannt *Diffusion Weighted Imaging*, den Infarktkern von der Peri-Infarktzone zu unterscheiden. Dieses Verfahren wird häufig auch im klinischen Alltag verwendet.

Für eine korrekte Einteilung in die Bereiche Infarktkern und Peri-Infarktzone in unseren Untersuchungen spricht, dass durchaus ein Trend im Vergleich der Gefäßdurchmesser zu erkennen war, der in Abschnitt 8.6.2 und Abschnitt 8.7.2 beschrieben ist.

Die gewählten Parameter zur Analyse der Gefäßmorphologie stellen lediglich einen Ausschnitt der möglichen Methoden dar. In Bezug auf die Analyse der Gefäße können neben der hier ausgeführten Parametern *Gefäßdurchmesser* und *Gefäßdichte* noch weitere Analyse, z.B. die Auswertung der Verzweigungspunkte (*engl.* branching points), die Gewundenheit der Gefäße oder die extravaskuläre Diffusionsstrecke, gewählt werden (Corliss et al., 2019).

#### 9.4 **Ausblick**

In Bezug auf den Durchmesser und die Dichte der Blutgefäße zeigten wir, dass eine systematische Untersuchung möglich ist. Folgen sollen nun noch die systematische Untersuchung der Neuronen sowie der Astrozyten nach ischämischem Schlaganfall und Ergebnisse über die Interaktion der genannten drei Komponenten der NVU.

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

- ABBOTT, N. J., RONNBACK, L. & HANSSON, E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7, 41-53.
- ABEYSINGHE, H. C., PHILLIPS, E. L., CHIN-CHENG, H., BEART, P. M. & ROULSTON, C. L. 2016. Modulating Astrocyte Transition after Stroke to Promote Brain Rescue and Functional Recovery: Emerging Targets Include Rho Kinase. *Int J Mol Sci*, 17, 288.
- ANDREONE, B. J., LACOSTE, B. & GU, C. 2015. Neuronal and vascular interactions. *Annu Rev Neurosci*, 38, 25-46.
- BAEZ, S. 1973. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res*, 5, 384-94.
- BAYERL, S. H., NIEMINEN-KELHA, M., BROGGINI, T., VAJKOCZY, P. & PRINZ, V. 2016a. Lateral Chronic Cranial Window Preparation Enables In Vivo Observation Following Distal Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *J Vis Exp*.
- BAYERL, S. H., NIESNER, R., CSERESNYES, Z., RADBRUCH, H., POHLAN, J., BRANDENBURG, S., CZABANKA, M. A. & VAJKOCZY, P. 2016b. Time lapse in vivo microscopy reveals distinct dynamics of microglia-tumor environment interactions-a new role for the tumor perivascular space as highway for trafficking microglia. *Glia*, 64, 1210-26.
- BECK, H. & PLATE, K. H. 2009. Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol*, 117, 481-96.
- BERGE, E., WHITELEY, W., AUDEBERT, H., DE MARCHIS, G. M., FONSECA, A. C., PADIGLIONI, C., DE LA OSSA, N. P., STRBIAN, D., TSIVGOULIS, G. & TURC, G. 2021. European Stroke Organisation (ESO) guidelines on intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Eur Stroke J*, 6, I-LXII.
- BOLLINGER, A., FREY, J., JAGER, K., FURRER, J., SEGLIAS, J. & SIEGENTHALER, W. 1982. Patterns of diffusion through skin capillaries in patients with long-term diabetes. *N Engl J Med*, 307, 1305-10.
- BOUABE, H. & OKKENHAUG, K. 2013. Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol Biol*, 1064, 315-36.
- BRANDA, C. S. & DYMECKI, S. M. 2004. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell*, 6, 7-28.
- BROWN, C. E., LI, P., BOYD, J. D., DELANEY, K. R. & MURPHY, T. H. 2007. Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke. *J Neurosci*, 27, 4101-9.
- CAMPAGNOLA, P. 2011. Second harmonic generation imaging microscopy: applications to diseases diagnostics. *Anal Chem*, 83, 3224-31.
- CANAZZA, A., MINATI, L., BOFFANO, C., PARATI, E. & BINKS, S. 2014. Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Front Neurol*, 5, 19.
- CARMICHAEL, S. T. 2005. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*, 2, 396-409.
- CHIANG, T., MESSING, R. O. & CHOU, W. H. 2011. Mouse model of middle cerebral artery occlusion. *J Vis Exp*.
- CIPOLLA, M. J. 2009. *The Cerebral Circulation*. San Rafael (CA).

- COLLABORATORS, G. B. D. C. O. D. 2017. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 390, 1151-1210.
- COLLABORATORS, G. B. D. L. R. O. S., FEIGIN, V. L., NGUYEN, G., CERCY, K., JOHNSON, C. O., ALAM, T., PARMAR, P. G., ABAJOBIR, A. A., ABATE, K. H., ABD-ALLAH, F., ABEJIE, A. N., ABYU, G. Y., ADEMI, Z., AGARWAL, G., AHMED, M. B., AKINYEMI, R. O., AL-RADDADI, R., AMINDE, L. N., AMLIE-LEFOND, C., ANSARI, H., ASAYESH, H., ASGEDOM, S. W., ATEY, T. M., AYELE, H. T., BANACH, M., BANERJEE, A., BARAC, A., BARKER-COLLO, S. L., BARNIGHAUSEN, T., BARREGARD, L., BASU, S., BEDI, N., BEHZADIFAR, M., BEJOT, Y., BENNETT, D. A., BENSENOR, I. M., BERHE, D. F., BONEYA, D. J., BRAININ, M., CAMPOS-NONATO, I. R., CASO, V., CASTANEDA-ORJUELA, C. A., RIVAS, J. C., CATALA-LOPEZ, F., CHRISTENSEN, H., CRIQUI, M. H., DAMASCENO, A., DANDONA, L., DANDONA, R., DAVLETOV, K., DE COURTEN, B., DEVEBER, G., DOKOVA, K., EDESSA, D., ENDRES, M., FARAON, E. J. A., FARVID, M. S., FISCHER, F., FOREMAN, K., FOROUZANFAR, M. H., GALL, S. L., GEBREHIWOT, T. T., GELEIJNSE, J. M., GILLUM, R. F., GIROUD, M., GOULART, A. C., GUPTA, R., GUPTA, R., HACHINSKI, V., HAMADEH, R. R., HANKEY, G. J., HARERI, H. A., HAVMOELLER, R., HAY, S. I., HEGAZY, M. I., HIBSTU, D. T., JAMES, S. L., JEEMON, P., JOHN, D., JONAS, J. B., JOZWIAK, J., KALANI, R., KANDEL, A., KASAEIAN, A., KENGNE, A. P., KHADER, Y. S., KHAN, A. R., KHANG, Y. H., KHUBCHANDANI, J., KIM, D., KIM, Y. J., KIVIMAKI, M., KOKUBO, Y., KOLTE, D., KOPEC, J. A., KOSEN, S., KRAVCHENKO, M., KRISHNAMURTHI, R., KUMAR, G. A., LAFRANCONI, A., et al. 2018. Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016. *N Engl J Med*, 379, 2429-2437.
- CORLISS, B. A., MATHEWS, C., DOTY, R., ROHDE, G. & PEIRCE, S. M. 2019. Methods to label, image, and analyze the complex structural architectures of microvascular networks. *Microcirculation*, 26, e12520.
- DENK, W., STRICKLER, J. H. & WEBB, W. W. 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248, 73-6.
- DIRNAGL, U. 2006. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26, 1465-78.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M. A. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22, 391-7.
- DONNAN, G. A., FISHER, M., MACLEOD, M. & DAVIS, S. M. 2008. Stroke. *Lancet*, 371, 1612-23.
- DUNN, K. W., SANDOVAL, R. M., KELLY, K. J., DAGHER, P. C., TANNER, G. A., ATKINSON, S. J., BACALLAO, R. L. & MOLITORIS, B. A. 2002. Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283, C905-16.
- FARRAR, M. J., BERNSTEIN, I. M., SCHLAFER, D. H., CLELAND, T. A., FETCHO, J. R. & SCHAFFER, C. B. 2012. Chronic in vivo imaging in the mouse spinal cord using an implanted chamber. *Nat Methods*, 9, 297-302.
- FEIL, R., WAGNER, J., METZGER, D. & CHAMBON, P. 1997. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*, 237, 752-7.
- FLURI, F., SCHUHMANN, M. K. & KLEINSCHNITZ, C. 2015. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther*, 9, 3445-54.

- FRANZECK U.K., H. U., BOLLINGER A. 1994. Beurteilung der Mikrozirkulation bei Durchblutungsstörungen.
- . In: JÄGER K.A., L. J. (ed.) *Praxis der angiologischen Diagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- FREITAS-ANDRADE, M., RAMAN-NAIR, J. & LACOSTE, B. 2020. Structural and Functional Remodeling of the Brain Vasculature Following Stroke. *Front Physiol*, 11, 948.
- GHORI, A., FREIMANN, F. B., NIEMINEN-KELHA, M., KREMENETSKAIA, I., GERTZ, K., ENDRES, M. & VAJKOCZY, P. 2017. EphrinB2 Activation Enhances Vascular Repair Mechanisms and Reduces Brain Swelling After Mild Cerebral Ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 37, 867-878.
- GRANT, R. T. 1964. Direct Observation of Skeletal Muscle Blood Vessels (Rat Cremaster). *J Physiol*, 172, 123-37.
- GRZYBOWSKI, A. & PIETRZAK, K. 2013. Maria Goeppert-Mayer (1906-1972): two-photon effect on dermatology. *Clin Dermatol*, 31, 221-5.
- HANKEY, G. J. 2017. Stroke. *Lancet*, 389, 641-654.
- HARRIS, A. G., HECHT, R., PEER, F., NOLTE, D. & MESSMER, K. 1997. An improved intravital microscopy system. *Int J Microcirc Clin Exp*, 17, 322-7.
- HARTSOCK, L. A., SEABER, A. V. & URBANIAK, J. R. 1989. Intravascular thrombosis in skeletal muscle microcirculation after ischemia. *Microsurgery*, 10, 161-6.
- HATAKEYAMA, M., NINOMIYA, I. & KANAZAWA, M. 2020. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke. *Neural Regen Res*, 15, 16-19.
- HAYASHI, T., NOSHITA, N., SUGAWARA, T. & CHAN, P. H. 2003. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 166-80.
- HEBB, D. O. 1949. *The Organization of Behavior: A neuropsychological Theory*, John Wiley And Sons, Inc., New York.
- HEFENDEHL, J. K., MILFORD, D., EICKE, D., WEGENAST-BRAUN, B. M., CALHOUN, M. E., GRATHWOHL, S. A., JUCKER, M. & LIEBIG, C. 2012. Repeatable target localization for long-term in vivo imaging of mice with 2-photon microscopy. *J Neurosci Methods*, 205, 357-63.
- HEO, C., PARK, H., KIM, Y. T., BAEG, E., KIM, Y. H., KIM, S. G. & SUH, M. 2016. A soft, transparent, freely accessible cranial window for chronic imaging and electrophysiology. *Sci Rep*, 6, 27818.
- HILL, R. A. & GRUTZENDLER, J. 2014. In vivo imaging of oligodendrocytes with sulforhodamine 101. *Nat Methods*, 11, 1081-2.
- HLUSHCHENKO, I., KOSKINEN, M. & HOTULAINEN, P. 2016. Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 73, 435-41.
- HORTON, N. G., WANG, K., KOBAT, D., CLARK, C. G., WISE, F. W., SCHAFFER, C. B. & XU, C. 2013. In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nat Photonics*, 7.
- HUANG, J., UPADHYAY, U. M. & TAMARGO, R. J. 2006. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol*, 66, 232-45.
- HULSMANN, S., HAGOS, L., HEUER, H. & SCHNELL, C. 2017. Limitations of Sulforhodamine 101 for Brain Imaging. *Front Cell Neurosci*, 11, 44.
- ISSHIKI, M. & OKABE, S. 2014. Evaluation of cranial window types for in vivo two-photon imaging of brain microstructures. *Microscopy (Oxf)*, 63, 53-63.

- ITO, U., KUROIWA, T., NAGASAO, J., KAWAKAMI, E. & OYANAGI, K. 2006. Temporal profiles of axon terminals, synapses and spines in the ischemic penumbra of the cerebral cortex: ultrastructure of neuronal remodeling. *Stroke*, 37, 2134-9.
- JIANG, X., ANDJELKOVIC, A. V., ZHU, L., YANG, T., BENNETT, M. V. L., CHEN, J., KEEP, R. F. & SHI, Y. 2018. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Prog Neurobiol*, 163-164, 144-171.
- KRUPINSKI, J., KALUZA, J., KUMAR, P., KUMAR, S. & WANG, J. M. 1994. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*, 25, 1794-8.
- LENHOSSÉK, M. V. 1895. *Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschungen.*, Berlin: Fischer's Medicinische Buchhandlung.
- LENZER, J. 2002. Alteplase for stroke: money and optimistic claims buttress the "brain attack" campaign. *BMJ*, 324, 723-9.
- LI, Y., RAKYMZHAN, A., TANG, P. & WANG, R. K. 2020. Procedure and protocols for optical imaging of cerebral blood flow and hemodynamics in awake mice. *Biomed Opt Express*, 11, 3288-3300.
- LIEBNER, S., DIJKHUIZEN, R. M., REISS, Y., PLATE, K. H., AGALLIU, D. & CONSTANTIN, G. 2018. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol*, 135, 311-336.
- LIU, B., TESCHEMACHER, A. G. & KASPAROV, S. 2017. Neuroprotective potential of astroglia. *J Neurosci Res*, 95, 2126-2139.
- LIU, L. R., LIU, J. C., BAO, J. S., BAI, Q. Q. & WANG, G. Q. 2020. Interaction of Microglia and Astrocytes in the Neurovascular Unit. *Front Immunol*, 11, 1024.
- LLOVERA, G., ROTH, S., PLESNILA, N., VELTKAMP, R. & LIESZ, A. 2014. Modeling stroke in mice: permanent coagulation of the distal middle cerebral artery. *J Vis Exp*, e51729.
- LOVINGER, D. M. 2008. Communication networks in the brain: neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol. *Alcohol Res Health*, 31, 196-214.
- MENG, G., LIANG, Y., SANSFIELD, S., JIANG, W. C., LU, R., DUDMAN, J. T., APONTE, Y. & JI, N. 2019. High-throughput synapse-resolving two-photon fluorescence microendoscopy for deep-brain volumetric imaging in vivo. *Elife*, 8.
- MIDDELDORP, J. & HOL, E. M. 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*, 93, 421-43.
- MOKIN, M., ANSARI, S. A., MCTAGGART, R. A., BULSARA, K. R., GOYAL, M., CHEN, M., FRASER, J. F. & SOCIETY OF NEUROINTERVENTIONAL, S. 2019. Indications for thrombectomy in acute ischemic stroke from emergent large vessel occlusion (ELVO): report of the SNIS Standards and Guidelines Committee. *J Neurointerv Surg*, 11, 215-220.
- MUOIO, V., PERSSON, P. B. & SENDESKI, M. M. 2014. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol (Oxf)*, 210, 790-8.
- MURASAWA, S. & ASAHARA, T. 2005. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)*, 20, 36-42.
- NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL, D. & STROKE RT, P. A. S. S. G. 1995. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 333, 1581-7.
- NIESNER, R., NARANG, P., SPIECKER, H., ANDRESEN, V., GERICKE, K. H. & GUNZER, M. 2008. Selective detection of NADPH oxidase in polymorphonuclear cells by means of NAD(P)H-based fluorescence lifetime imaging. *J Biophys*, 2008, 602639.
- NIMMERJAHN, A. & HELMCHEN, F. 2012. In vivo labeling of cortical astrocytes with sulforhodamine 101 (SR101). *Cold Spring Harb Protoc*, 2012, 326-34.

- NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F., KERR, J. N. & HELMCHEN, F. 2004. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods*, 1, 31-7.
- OBERMEIER, B., DANEMAN, R. & RANSOHOFF, R. M. 2013. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*, 19, 1584-96.
- OSSWALD, M. & WINKLER, F. 2013. Insights into cell-to-cell and cell-to-blood-vessel communications in the brain: in vivo multiphoton microscopy. *Cell Tissue Res*, 352, 149-59.
- PATAN, S. 2004. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res*, 117, 3-32.
- PITULESCU, M. E., SCHMIDT, I., BENEDITO, R. & ADAMS, R. H. 2010. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc*, 5, 1518-34.
- RADAK, D., KATSIKI, N., RESANOVIC, I., JOVANOVIC, A., SUDAR-MILOVANOVIC, E., ZAFIROVIC, S., MOUSAD, S. A. & ISENOVIC, E. R. 2017. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Curr Vasc Pharmacol*, 15, 115-122.
- RAKHYMZHAN, A., REUTER, L., RASPE, R., BREMER, D., GUNTHER, R., LEBEN, R., HEIDELIN, J., ANDRESEN, V., CHEREMUKHIN, S., SCHULZ-HILDEBRANDT, H., BIXEL, M. G., ADAMS, R. H., RADBRUCH, H., HUTTMANN, G., HAUSER, A. E. & NIESNER, R. A. 2020. Coregistered Spectral Optical Coherence Tomography and Two-Photon Microscopy for Multimodal Near-Instantaneous Deep-Tissue Imaging. *Cytometry A*, 97, 515-527.
- REISMANN, D., STEFANOWSKI, J., GUNTHER, R., RAKHYMZHAN, A., MATTHYS, R., NUTZI, R., ZEHENTMEIER, S., SCHMIDT-BLEEK, K., PETKAU, G., CHANG, H. D., NAUNDORF, S., WINTER, Y., MELCHERS, F., DUDA, G., HAUSER, A. E. & NIESNER, R. A. 2017. Longitudinal intravital imaging of the femoral bone marrow reveals plasticity within marrow vasculature. *Nat Commun*, 8, 2153.
- ROSENBERG, G. A. 1999. Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis*, 42, 209-16.
- SAVER, J. L. 2006. Time is brain--quantified. *Stroke*, 37, 263-6.
- SCHNELL, C., SHAHMORADI, A., WICHERT, S. P., MAYERL, S., HAGOS, Y., HEUER, H., ROSSNER, M. J. & HULSMANN, S. 2015. The multispecific thyroid hormone transporter OATP1C1 mediates cell-specific sulforhodamine 101-labeling of hippocampal astrocytes. *Brain Struct Funct*, 220, 193-203.
- SCHWARZMAIER, S. M., GALLOZZI, M. & PLESNILA, N. 2015. Identification of the Vascular Source of Vasogenic Brain Edema following Traumatic Brain Injury Using In Vivo 2-Photon Microscopy in Mice. *J Neurotrauma*, 32, 990-1000.
- SHIH, A. Y., DRISCOLL, J. D., DREW, P. J., NISHIMURA, N., SCHAFFER, C. B. & KLEINFELD, D. 2012. Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32, 1277-309.
- SIERRA, A., DE CASTRO, F., DEL RIO-HORTEGA, J., RAFAEL IGLESIAS-ROZAS, J., GARROSA, M. & KETTENMANN, H. 2016. The "Big-Bang" for modern glial biology: Translation and comments on Pio del Rio-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*, 64, 1801-40.
- SIMS, N. R. & YEW, W. P. 2017. Reactive astrogliosis in stroke: Contributions of astrocytes to recovery of neurological function. *Neurochem Int*, 107, 88-103.
- SOMMER, C. J. 2017. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, 133, 245-261.
- STEFANOWSKI, J., FIEDLER, A. F., KOHLER, M., GUNTHER, R., LIUBLIN, W., TSCHAIKNER, M., RAUCH, A., REISMANN, D., MATTHYS, R., NUTZI, R., BIXEL, M. G., ADAMS, R. H., NIESNER, R. A., DUDA, G. N. & HAUSER, A. E. 2020.

- Limbostomy: Longitudinal Intravital Microendoscopy in Murine Osteotomies. *Cytometry A*, 97, 483-495.
- SWANSON, R. A., YING, W. & KAUPPINEN, T. M. 2004. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med*, 4, 193-205.
- THOMPSON, R. J., ZHOU, N. & MACVICAR, B. A. 2006. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science*, 312, 924-7.
- TRACHTENBERG, J. T., CHEN, B. E., KNOTT, G. W., FENG, G., SANES, J. R., WELKER, E. & SVOBODA, K. 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 420, 788-94.
- TSIEN, R. Y., RINK, T. J. & POENIE, M. 1985. Measurement of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium*, 6, 145-57.
- TURC, G., BHOGAL, P., FISCHER, U., KHATRI, P., LOBOTESIS, K., MAZIGHI, M., SCHELLINGER, P. D., TONI, D., DE VRIES, J., WHITE, P. & FIEHLER, J. 2019. European Stroke Organisation (ESO) - European Society for Minimally Invasive Neurological Therapy (ESMINT) Guidelines on Mechanical Thrombectomy in Acute Ischaemic Stroke Endorsed by Stroke Alliance for Europe (SAFE). *Eur Stroke J*, 4, 6-12.
- VIRCHOW, R. 1871. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*, Hirschwald.
- WEINTRAUB, M. I. 2006. Thrombolysis (tissue plasminogen activator) in stroke: a medicolegal quagmire. *Stroke*, 37, 1917-22.
- WHITCOMB, D. J., REGAN, P. & CHO, K. 2011. The synapse and brain function. *Semin Cell Dev Biol*, 22, 488-91.
- WILLIAMSON, M. R., FRANZEN, R. L., FUERTES, C. J. A., DUNN, A. K., DREW, M. R. & JONES, T. A. 2020. A Window of Vascular Plasticity Coupled to Behavioral Recovery after Stroke. *J Neurosci*, 40, 7651-7667.
- WINSTEIN, C. J., STEIN, J., ARENA, R., BATES, B., CHERNEY, L. R., CRAMER, S. C., DERUYTER, F., ENG, J. J., FISHER, B., HARVEY, R. L., LANG, C. E., MACKAY-LYONS, M., OTTENBACHER, K. J., PUGH, S., REEVES, M. J., RICHARDS, L. G., STIERS, W., ZOROWITZ, R. D., AMERICAN HEART ASSOCIATION STROKE COUNCIL, C. O. C., STROKE NURSING, C. O. C. C., COUNCIL ON QUALITY OF, C. & OUTCOMES, R. 2016. Guidelines for Adult Stroke Rehabilitation and Recovery: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 47, e98-e169.
- XIONG, B., LI, A., LOU, Y., CHEN, S., LONG, B., PENG, J., YANG, Z., XU, T., YANG, X., LI, X., JIANG, T., LUO, Q. & GONG, H. 2017. Precise Cerebral Vascular Atlas in Stereotaxic Coordinates of Whole Mouse Brain. *Front Neuroanat*, 11, 128.
- XU, G., WANG, W., KIMELBERG, H. K. & ZHOU, M. 2010. Electrical coupling of astrocytes in rat hippocampal slices under physiological and simulated ischemic conditions. *Glia*, 58, 481-93.
- XU, S., LU, J., SHAO, A., ZHANG, J. H. & ZHANG, J. 2020. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Front Immunol*, 11, 294.
- YANG, G., PAN, F., PARKHURST, C. N., GRUTZENDLER, J. & GAN, W. B. 2010. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc*, 5, 201-8.
- YOUNG, P., QIU, L., WANG, D., ZHAO, S., GROSS, J. & FENG, G. 2008. Single-neuron labeling with inducible Cre-mediated knockout in transgenic mice. *Nat Neurosci*, 11, 721-8.

- ZHANG, S. & MURPHY, T. H. 2007. Imaging the impact of cortical microcirculation on synaptic structure and sensory-evoked hemodynamic responses in vivo. *PLoS Biol*, 5, e119.
- ZHAO, H. L. & HUANG, Y. 2019. Lifetime Risk of Stroke in the Global Burden of Disease Study. *N Engl J Med*, 380, 1377-1378.
- ZHUO, L., SUN, B., ZHANG, C. L., FINE, A., CHIU, S. Y. & MESSING, A. 1997. Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice. *Dev Biol*, 187, 36-42.
- ZLOKOVIC, B. V. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57, 178-201.

## 11 EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Kim Cornelia Fischer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Langzeitanalyse der neurovaskulären Einheit nach ischämischem Schlaganfall mittels Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie / Long-term analysis of the neurovascular unit after ischemic stroke using two-photon fluorescence microscopy“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

## 12 **LEBENS LAUF**

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

## 13 PUBLIKATIONSLISTE

Kongressbeiträge:

### **72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) (2021):**

„A novel technique for in vivo live cell imaging of the cellular components of the neurovascular unit (NVU) / Eine neue Technik für in vivo live Untersuchung der zellulären Bestandteile der neurovaskulären Einheit (NVU)“

(Christian Uhl, Adnan Ghori, Kim Fischer, Asylkhan Rakhymzhan, Melina Nieminen-Kelhä, Peter Vajkoczy)

### **73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) (2022):**

"An implanted spinal window chamber allows for chronic longitudinal in vivo microscopy following experimental Spinal Cord Injury in the mouse / Chronische longitudinale in vivo Mikroskopie mittels implantierter Rückenmarks-kammer nach experimenteller traumatischer Rückenmarksschädigung in der Maus"

(Laurens Roolfs, Nima Taheri, Lea Meyer, Lilly Waldmann, Katharina Kersting, Melina Nieminen-Kelhä, Kim Cornelia Fischer, Christian Uhl, Jan-Erik Ode, Michael G. Fehlings, Peter Vajkoczy, Vanessa Hubertus)

## 14 DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Klinikdirektor der Neurochirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Herrn Prof. Dr. Peter Vajkoczy, für die Bereitstellung des Themas und der Forschungsmöglichkeiten bedanken. Der stets interessierte Austausch war von elementarer Bedeutung für das Gelingen dieser Arbeit.

Außerdem danke meinem Betreuer, Herrn Dr. Adnan Ghori, für die Einarbeitung in die Forschungsfrage und den fachlichen Austausch.

Herrn Dr. Christian Uhl danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei dem Gelingen meiner eigenen Forschungstätigkeit.

Frau Melina Nieminen-Kelhä danke ich für die Hilfe in allen versuchstierkundlichen Fragestellungen.

Frau Sabine Seidlitz danke ich für die Hilfe in allen organisatorischen Fragestellungen meiner Forschungsarbeit.

Frau Susanne Müller danke ich für die Einweisung und die Hilfestellung bei der Arbeit am Kleintier-Magnetresonanztomographen.

Unseren Kooperationspartnern des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums, den Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. Anja Hauser und Frau Prof. Dr. Raluca Niesner, danke ich für die Möglichkeit das Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskop sowie das Bildbearbeitungsprogramm Imaris zu nutzen. Ich möchte mich bei Herrn Dr. Asylkhan Rakhymzhan und Herrn Alexander Fiedler für die Einarbeitung in beide Systeme und den wissenschaftlichen Austausch bedanken.

Bei Herrn Jörg Rösner bedanke ich mich für die Einarbeitung in die konfokale Laserscanmikroskopie und den wissenschaftlichen Austausch.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihr Zuhören und ihre Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit und meines gesamten Studiums.

# 15 BESCHEINIGUNG STATISTIK



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

**Name, Vorname:** Fischer, Kim Cornelia  
**Emailadresse:** kim.fischer@charite.de  
**Matrikelnummer:** 224206  
**PromotionsbetreuerIn:** Prof. Dr. Peter Vajkoczy  
**Promotionsinstitution / Klinik:** CC15 Klinik für Neurochirurgie  
**CCM**

**Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBiKE)**

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:  
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin  
Besucheranschrift:  
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171  
geraldine.rauch@charite.de  
<https://biometrie.charite.de/>



## Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau Kim Fischer innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 27.07.2020
- Termin 2: 08.02.2021
- Termin 3: 09.06.2021

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Erste Methodenetablierung in der experimentellen Neurochirurgie, sehr kleine Fallzahl
- Statistische Auswertung: Mittelwerte über die Zeit in Grafik auftragen, ggf. Boxplots erstellen, T-tests zwischen Gruppen zu jedem Zeitpunkt berechnen

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein der Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 09.06.2021



Name der Beraterin: Anne Pohrt

UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN  
Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie  
Campus Charité Mitte  
Charité  
Besucheranschrift

Unterschrift Beraterin, Institutsstempel

