

DISSERTATION

Regulatorische T-Zellen bei Patienten nach ischämischem Hirninfarkt

Regulatory T-cells in patients with ischemic stroke

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Lünstedt

Erstbetreuung: Prof. Friedemann Paul

Datum der Promotion: 20.Juni 2025

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VIII
Abstract	X
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Pathophysiologie des ischämischen Hirninfarkts	1
1.2 Infektionen nach zerebraler Ischämie	2
1.3 Regulatorische T-Zellen (Treg)	3
1.4 Immunologie des Hirninfarkts	6
1.4.1 Pro-inflammatorische Phase des Hirninfarkts	6
1.4.2 Immunsuppressive Phase des Hirninfarkts (engl. <i>stroke induced immunodepression</i> , SIID) und die Rolle der Treg	8
1.5 Statine und ihre Rolle in der Immunologie	9
1.6 Zielsetzung der Arbeit	11
2 Materialien und Methoden	12
2.1 Laborartikel	12
2.1.1 Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien	12
2.1.2 Antikörper und Sekundärfarbstoffe	13
2.1.3 Sonstige Reagenzien und Chemikalien	13
2.1.4 Kunststoffartikel und sonstige Materialien	14
2.1.5 Verwendete Software	14
2.1.6 Geräte	15
2.2 Studienpopulation	15
2.3 Studienprotokoll	16
2.4 Zellbiologische Methoden	19
2.4.1 Isolierung von PBMC aus Heparin-Blut – Dichtegradientenzentrifugation	19
2.5 Durchflusszytometrie	19
2.5.1 Prinzip	19
2.5.2 Nachweis von Oberflächenproteinen	21

2.5.3	Intrazelluläre FoxP3-Färbung.....	21
2.5.4	Analyse	22
2.6	Erhebung der klinischen Parameter für die Korrelationsanalyse.....	22
2.7	Statistik	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Charakterisierung der Studienpopulation	24
3.2	Nachgewiesene Subpopulationen in der Durchflusszytometrie.....	25
3.3	Zeitlicher Verlauf von CD4+-T-Zellen und von Treg bei Hirninfarkt-Patienten.....	26
3.4	Vergleich der Lymphozyten-Zahlen bei Patienten mit und ohne Infekt	27
3.5	Vergleich der Lymphozyten-Zahlen bei Patienten mit und ohne Statin-Therapie.....	31
3.6	Vergleich der Lymphozytenzahlen bei Patienten mit unterschiedlicher Besserung des Gesundheitszustands	34
4	Diskussion	36
4.1	CD4+-T-Lymphozyten bei Hirninfarktpatienten	36
4.2	Infektionen bei Hirninfarktpatienten	38
4.3	Verlauf von Treg bei Patienten mit ischämischem Hirninfarkt	38
4.4	Treg und Infektionen bei Hirninfarktpatienten.....	40
4.5	Klinisches Ergebnis und Treg	41
4.6	Treg und Statine	42
4.7	Limitationen	43
4.8	Schlussfolgerungen	44
5	Referenzen.....	45
6	Anhang.....	57
6.1	Eidesstattliche Versicherung	57
6.2	Lebenslauf	58
6.3	Publikationsliste.....	59
6.4	Danksagung.....	60

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Reaktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems nach einem akuten Hirninfarkt	8
Abbildung 2: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Untersuchung	16
Abbildung 3: Durchflusszytometrische Analyse der peripheren mononukleären Blutzellen (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , PBMC)	26
Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Anzahl von CD4+-T-Zellen (A) und CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen (Treg; B) im Blut von Hirninfarktpatienten (n=59). Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle.	27
Abbildung 5: Vergleich der T-Zellsubpopulationen bei Hirninfarktpatienten mit (n=21) und ohne (n=38) Infekt. Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle.	28
Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der T-Zell-Subpopulationen bei Hirninfarkt-Patienten mit (n=21) und ohne (n=38) Infekt. Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle.	30
Abbildung 7: Vergleich der T-Zell-Subpopulationen bei Hirninfarkt-Patienten ohne Statin-Therapie (n=19) bzw. mit einer Statin-Therapie vor und nach (n=14) oder nur nach (n=21) dem Hirninfarkt. Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle.	32
Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der T-Zell-Subpopulationen bei Hirninfarkt-Patienten ohne Statin-Therapie (n=19) bzw. mit einer Statin-Therapie vor und nach (n=14) oder nur nach (n=21) dem Hirninfarkt. Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle.	33
Abbildung 9: Vergleich der T-Zell-Subpopulationen bei Patienten mit gutem klinischen Ergebnis und schlechtem klinischen Ergebnis, gemessen mittels mRS. Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle.	35

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Subgruppen der regulatorischen T-Zellen (Treg)	5
Tabelle 2: Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien.....	12
Tabelle 3: Antikörper und Isotypen	13
Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien	13
Tabelle 5: Kunststoffartikel und sonstige Materialien	14
Tabelle 6: Software	14
Tabelle 7: Geräte	15
Tabelle 8: NIHSS.....	17
Tabelle 9: mRS.....	18
Tabelle 10: Messparameter am FACS Canto II	21
Tabelle 11: Charakteristika der Studienpopulation (n=59)	24
Tabelle 12: Veränderungen von Parametern des Immunsystems bei Patienten mit Infektionen nach Hirninfarkt.....	41

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
CD	Oberflächenmarker; engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	engl.: <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> – zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
FACS	Durchflusszytometrie, engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum, engl.: <i>fetal calf serum</i>
FPP	Farnesylpyrophosphat
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FoxP3	engl.: <i>forkhead-box-protein P3</i>
FSC	engl.: <i>forward scatter</i> - Vorwärtsstreulicht
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
ICAM	engl.: <i>intercellular adhesion molecule</i> – interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
LFA	Lymphocyte function-associated antigen
MCAO	Okklusion der Arteria cerebri media, engl.: <i>middle cerebral artery occlusion</i>
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i>
mRS	modifizierte Rankin-Skala

MRT	Magnetresonanztomogramm
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
NF-κB	Engl.: <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NIHSS	Engl.: <i>National Institute of Health Stroke Scale</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	engl: nucleotide-binding oligomerization domain
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen; engl: <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, engl: <i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
rcf	engl.: <i>relative centrifugal force</i>
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute Medium</i>
SA	Streptavidin
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	engl.: side scatter - Seitwärtsstreulicht
STAT 3	engl.: <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TGF	engl.: <i>transforming growth factor</i> – transformierender Wachstumsfaktor
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
Th	T-Helferzelle
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TOAST	engl.: <i>Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i>
Tr1	Typ 1 regulatorische T-Zelle
Treg	regulatorische T-Zelle
SA	Streptavidin
SSC	engl.: <i>side scatter</i>

TLR	engl.: <i>toll-like receptor</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Einleitung: Der ischämische Hirninfarkt ist mit einer hohen Letalität und Morbidität assoziiert. Das Infarktvolumen ist ein wichtiger Faktor für die Prognose. Es ist unter anderem abhängig vom Ausmaß der Immunreaktion im ischämischen Areal, bestehend aus Leukozyten-Invasion und Sekretion von Entzündungsmediatoren im zentralen Nervensystem (ZNS). Laut Untersuchungen am Modell kommt es durch eine Hemmung dieser durch T-Zellen mitverursachten Inflammationsprozesse zu geringerem Infarktvolumen und gebessertem klinischen Ergebnis. Neben der lokalen Immunaktivierung kommt es auch zu einer systemischen Immunsuppression. In deren Folge beobachtet man systemische Infektionen, die ebenfalls die Prognose verschlechtern. Eine mögliche Erklärung für das Nebeneinander einer lokalen inflammatorischen Antwort nach Hirninfarkt und einer eingeschränkten systemischen Immunreaktion ist die Induktion gegenregulatorischer Mechanismen, um eine überschießende Entzündung im ZNS zu verhindern. In dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, inwiefern regulatorische T-Zellen (Treg) nach Hirninfarkt nachweisbar sind und wie sie im Verlauf variieren. Die regulatorischen T-Zell-Zahlen wurden mit klinischen und paraklinischen Parametern korreliert.

Methodik: In der vorliegenden explorativen prospektiven Studie wurden 59 Personen mit akutem ischämischen Hirninfarkt rekrutiert. Es erfolgten Blutentnahmen bei Aufnahme sowie an Tag 1, 2, 3 und 4 und in Woche 4–6 nach dem Infarkt zur Asservierung von Lymphozyten, die zunächst kryokonserviert wurden. Anschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse verschiedener T-Zell-Populationen über den zeitlichen Verlauf. Betrachtet wurden die gesamte CD4⁺ T-Zellpopulation und Treg-Population. Es wurden mögliche Korrelationen der Anzahl und des zeitlichen Verlaufes dieser Zellpopulationen mit klinischen Daten (Auftreten eines Infektes, klinisches Ergebnis bei Entlassung, Statin-Therapie) analysiert.

Ergebnisse: Hirninfarkt-Patienten mit Infekt zeigten signifikant weniger CD4⁺-T-Zellen und Treg als solche ohne Infekt. Erfolgte eine Statin-Therapie nach dem Hirninfarkt waren signifikant mehr Treg nachweisbar. Patienten mit einem besseren klinischen Ergebnis wiesen eine signifikant höhere Anzahl an CD4⁺ T-Zellen und Treg auf.

Schlussfolgerungen: Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen das Konzept der Hirninfarkt-induzierten Immunsuppression. Zur Identifikation der Untergruppe von

Hirnfarkt-Patienten, die von einer Statin-Therapie profitieren könnten und zur Festlegung des optimalen Zeitpunkts des Beginns der Statin-Therapie, sind mehr Untersuchungen nötig.

Limitierungen: Vermutlich würde eine größere Stichprobe, ein multizentrisches Studiendesign sowie eine Langzeitbeobachtung zu einer besseren Repräsentation führen. Eine Kontrollgruppe könnte die Kausalität beobachteter Effekte einschränken. Es ist möglich, dass durch die Auswahl der Zeitpunkte, in denen T-Zell-Populationen untersucht wurden, Veränderungen nicht erfasst wurden.

Abstract

Introduction: Ischemic stroke is associated with a high lethality and disability. Local inflammation in the ischemic area brings forth leukocyte invasion and secretion of pro-inflammatory cytokines in the central nervous system (CNS) which in turn increases the infarct volume and can adversely affect the prognosis of the patient. In experimental models of brain ischemia, it was shown that a limitation of the occurring inflammation caused among others by T-cell subpopulations can lead to reduced tissue damage and a better clinical outcome. Aside from an immune activation at the site of perfusion there was evidence of a systemic immunosuppression in patients with ischemic stroke. Clinical data show an increase of nosocomial infection after ischemic stroke which can further worsen the outcome regarding permanent disability and death. A possible explanation for the simultaneous occurrence of a local inflammatory response after brain ischemia and a systemic immunodepression with a high incidence for infection could be the induction of regulatory mechanisms in order to prevent an overshooting inflammation in the CNS. The aim of this study was to investigate to which extent regulatory T cells (Treg) can be found after cerebral ischemia and how their amount varies over time. The number of Treg was correlated to clinical and paraclinical parameters.

Methods: In the present study 59 patients with ischemic stroke were included and blood samples were taken on admission as well as on days 1,2,3 and 4 after onset of stroke and 4-6 weeks later. A flow cytometry analysis of several T-cell-subpopulations was performed over the course of time. Analysis included the CD4+ T-cell subset and the Treg population. The resulting data was then compared with clinical findings (occurrence of nosocomial infection, clinical outcome on discharge, treatment with statin) and observed over the course of time.

Results: The blood of stroke patient who suffered additionally from an infection contained significantly less CD4+ T-cells and Treg as compared to those who did not show signs of infection. Patients who received a treatment with statin after stroke had significantly more Treg in their blood samples. Patients with a better clinical outcome had significantly higher numbers of CD4+ T-cells and Treg in their blood samples.

Conclusions: The results shown in this study support the concept of a stroke-induced immunosuppression. To find out which subgroups of stroke patient could possibly benefit

from a statin treatment and to determine when this treatment should be started further investigation is needed.

Limitations: A bigger sample size, a multicentric study design and a long-term observation might give a better representability of the results. The causality of observed effects could be diminished by a control group. It is possible that some alterations in the T-cell-populations were not registered during sample gathering at the chosen time points.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Pathophysiologie des ischämischen Hirninfarkts

Auslöser eines ischämischen Hirninfarkts ist eine transient oder permanent ungenügende arterielle Versorgung des Gehirnparenchyms. Weltweit gehört er zu den führenden Ursachen für Mortalität und Morbidität (1). 2021 wurden in deutschen Krankenhäusern in etwa 250 000 Schlaganfälle behandelt (2), die Sterblichkeit lag bei 18,2 je 100 000 Einwohnern (3). Durch die Optimierung der Akutversorgung konnte in den vergangenen Jahren ein deutlicher Rückgang der Mortalität erreicht werden. Dennoch gehört der Hirninfarkt nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. 2021 nahm der Hirninfarkt Platz 6 unter den durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen bedingten Todesfällen ein; insgesamt war er für 1,5 % aller Todesfälle in Deutschland verantwortlich (4). Die Behandlungs- und Folgekosten stellen eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem dar (5, 6).

Der reduzierte arterielle Blutfluss ist meist Folge eines Embolus oder einer lokalen Thrombose. Anhand der „*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*“ (TOAST) Kriterien werden Schlaganfälle entsprechend ihrer wahrscheinlichen Genese eingeteilt (7):

- Arteriosklerose großer hirnversorgender Arterien
- kardiale Embolie
- Verschluss kleinerer Hirnarterien
- andere definierte Ursachen
- unklare Ätiologie

Bei Durchblutungsstörungen mit entsprechender Symptomatik, die sich innerhalb von 24 h vollständig zurückbilden, spricht man von transitorischen ischämischen Attacken (TIA). Hält die Symptomatik mehr als 24 h an, handelt es sich um einen ischämischen Hirninfarkt.

Bei der Pathogenese des ischämischen Hirninfarkts handelt es sich um eine komplexe Abfolge verschiedener Mechanismen (Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, Exzitotoxizität, Inflammation, programmierter Zelltod). Durch das Fehlen von Sauerstoff und Glukose aufgrund der eingeschränkten Blutzufuhr kommt es in den Neuronen zu einem Energiedefizit und zu einer Depolarisation. Die Folgen sind eine Exzitotoxizität, ein Kalzium-Einstrom und eine Ödembildung in den Zellen. Schließlich kommt es zum Untergang der Neurone durch Nekrose und Apoptose.

Die Randzone des Infarktareals wird Penumbra genannt. In diesem Bereich kommt die Perfusion nicht vollständig zum Erliegen und die Zellen depolarisieren nur intermittierend. Es besteht jedoch die Gefahr, dass repolarisierte Zellen erneut depolarisieren (*peri-infarct depolarisations*), wodurch sich das irreversibel geschädigte Infarktareal vergrößern kann (8, 9). Diese Region ist von besonderem Interesse, da durch die Reduktion des sekundären Schadens die Prognose der betroffenen Patienten verbessert werden kann. Zur Beurteilung des Ausmaßes der Funktionseinschränkung nach einem Hirninfarkt existieren verschiedene standardisierte klinische Intensitätsskalen. Am häufigsten verwendet werden der „*National Institute of Health Stroke Scale*“ (NIHSS), der Barthel-Index und die modifizierte Rankin-Skala (mRS) (10).

1.2 Infektionen nach zerebraler Ischämie

Obduktionen ergaben, dass ein Versterben innerhalb der ersten Woche nach einem Hirninfarkt ereignis meist aufgrund des direkten Hirnschadens (z. B. Hirnschwellung, transtentorielle Einklemmung) erfolgt. Die Ursachen für ein Versterben zu einem späteren Zeitpunkt sind laut Obduktionsergebnissen und klinischen Studien komplikative Ereignisse, zu denen auch Infektionen (engl. *stroke associated infections*, SAI) gehören (11-13). Es ist schon länger bekannt, dass Patienten mit Hirninfarkt eine erhöhte Inzidenz an Infektionen aufweisen, wobei Pneumonien und Harnwegsinfektionen dominieren (12, 14). In größeren Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Pneumonie einen negativen Einfluss auf das funktionelle Outcome nach einem ischämischen Hirninfarkt hat und mit einer erhöhten Mortalität einhergeht (15). In einer Longitudinalstudie mit 16518 Patienten wurde bei über 12 % der im Krankenhaus verstorbenen Hirninfarkt-Patienten eine Pneumonie nachgewiesen (16).

Zunächst erscheint es nicht erstaunlich, dass bei bettlägerigen Hirninfarktpatienten, die häufig an Dysphagie leiden und einliegende Katheter haben, Infektionen gehäuft vorkommen. Die in Kapitel 1.4.2 genannten Veränderungen nach einer zerebralen Ischämie liefern jedoch deutliche Hinweise dafür, dass – unabhängig von diesen Risikofaktoren – weitere Faktoren wie Lymphopenie, erniedrigte Spiegel der proinflammatorischen Zytokine, gestörte Funktion der Lymphozyten und Atrophie der sekundären Lymphorgane das Auftreten von Infektionen bei Hirninfarktpatienten begünstigen. In einer tierexperimentellen Untersuchung entwickelten die Mäuse drei Tage nach einer Okklusion der *Arteria cerebri media* (engl: *middle cerebral artery*

occlusion, MCAO) eine Pneumonie und Bakteriämie. Dabei war eine deutliche Abnahme von Lymphozyten in Milz und Thymus nachweisbar (17, 18).

Bezüglich eines positiven Effekts einer präventiven Verabreichung von Antibiotika fehlen derzeit einheitliche Ergebnisse. In einem experimentellen Modell profitierten die Tiere von einer prophylaktischen antibiotischen Behandlung mit dem Fluoroquinolon Enrofloxacin (19). Die behandelten Tiere wiesen eine geringere Inzidenz an Pneumonie und eine geringere Mortalität auf. An dieses Ergebnis schlossen einige klinische Studien an, die sich allerdings im Studiendesign (Einschlusskriterien, Art des Hirninfarkts, eingesetztem Antibiotikum und Therapiedauer) voneinander unterschieden. Einige Studien zeigten einen Vorteil der prophylaktischen antibiotischen Therapie im Hinblick auf die Inzidenz von Infektionen (20, 21). Bei anderen Untersuchungen hingegen, darunter zwei große Phase III Studien, zeigte sich kein Vorteil im Hinblick auf Funktionalität oder Mortalität (22-24).

1.3 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Pathogenen. Gleichzeitig sind Mechanismen erforderlich, die nicht-adäquate Immunreaktionen verhindern. Schon bei ihrer Entstehung im Thymus werden T-Zellen, die Autoantigene erkennen, durch negative Selektion aussortiert. Dieses Phänomen wird zentrale Toleranz genannt. Das System arbeitet nicht vollkommen, so dass einige autoreaktive Zellen dieser ersten Kontrolle entkommen. Werden diese T-Lymphozyten durch ihr spezifisches Autoantigen aktiviert, kann es zu einer Autoimmunerkrankung kommen.

Eine weitere wichtige Kontrollinstanz des Immunsystems zur Verhinderung von autoimmunen Reaktionen sind die Treg. Sie entstehen entweder bereits im Thymus als natürliche Treg oder aus anderen T-Helferzellen bei bestimmten Umgebungsbedingungen in der Peripherie (induzierte Treg, Tabelle 1) (25, 26). Natürliche Treg sind durch die Expression der Oberflächenmarker (engl. *cluster of differentiation*, CD) CD4, CD25 und des Transkriptionsfaktors *forkhead-box-protein P3* (FoxP3) charakterisiert (27, 28). Allerdings ist keiner der Marker exklusiv auf Treg zu finden (29). Treg weisen eine hohe Dichte an CD25 auf und werden daher als CD25^{hi} (engl. *high*) bezeichnet. Menschen oder Tiere, denen FoxP3 fehlt oder bei denen die Funktion des Faktors eingeschränkt ist, weisen schwere Immundefekte auf (30-32). Es zeigte sich aber, dass in Menschen auch nicht-regulatorische T-Zellen vorübergehend

nach Aktivierung FoxP3 exprimieren können (33). Um Treg nachweisen zu können, wird daher eine Kombination aus Oberflächenmarkern verwendet (34). Unter anderem hat sich zusätzlich der Marker CD127 bewährt (35, 36). Eine humane T-Zellpopulation, die durch die Expression von CD4+, CD25+ CD127- charakterisiert war, wies im Gegensatz zu der Population mit den Markern CD4+, CD25+ und CD127^{hi} supprimierende Eigenschaften und eine hohe Expression von FoxP3 auf (36). Treg können die Aktivierung, Proliferation und Funktion verschiedener Immunzellen, darunter CD4+- und CD8+-T-Zellen, natürliche Killerzellen, B-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APC), in vivo und in vitro unterdrücken.

Es wird angenommen, dass Treg je nach Lokalisation und Milieu unterschiedliche Mechanismen zur Kontrolle potenzieller Autoimmunantworten anwenden. Sie sind für die Homöostase des Immunsystems unverzichtbar. Bei einer fehlenden Treg-Population kommt es zu zum Teil schwerwiegenden Autoimmunerkrankungen und Allergien (32, 37, 38). Schon vor Jahrzehnten konnte nachgewiesen werden, dass eine Thymektomie bei neugeborenen Mäusen Autoimmunerkrankungen zur Folge hat (29). Eine Population von T-Zellen, die autoreaktive T-Zellen inhibiert, wurde erstmals 1995 beschrieben. Nach einer Depletion von CD25+-T-Helferzellen kam es zu einer Autoimmungastritis, die sich durch die Gabe von CD4+ CD25+-Zellen verhindern ließ (27). Lange Zeit wurde angenommen, dass T-Zellen nicht im gesunden Gehirn vorkommen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass im Tiermodell auch im gesunden Gehirn Treg vorkommen. Vermutlich unterstützen sie hier die Homöostase und verhindern Neuroinflammation (39). Neben den natürlichen Treg sind noch induzierbare Treg bekannt. Diese entstehen in der Peripherie aus naiven T-Zellen oder können in vitro hergestellt werden (40). In vivo und in vitro können sie durch Stimulation induziert werden und hemmen die Proliferation von T-Zellen in experimentellen Autoimmunerkrankungen (41). Sie werden unterteilt in Tr1-Zellen und Th3-Zellen und unterscheiden sich vor allem in ihrem Zytokinprofil (42).

Tabelle 1: Subgruppen der regulatorischen T-Zellen (Treg) (26, 43-45)

Eigenschaft	natürliche Treg	induzierte Treg – Tr1	induzierte Treg – Th3
Entstehungsort	Thymus	Peripherie, ex vivo oder in vitro induziert	Peripherie (MALT)
Phänotyp	CD4+ CD25 ^{hi} CD127-	CD4+ CD25-	CD4+ CD25+ (von CD25- Vorgängern)
Andere Marker	CTLA4+ GITR+ FoxP3+	CD45RB ^{low} FoxP3- LAG-3+ CD49b+	CD45RB ^{low} FoxP3+
Suppression	Zellkontakt-abhängig	Hauptsächlich IL-10 vermittelt, aber auch Zellkontakt-abhängig, Zytotoxizität	TGF- β vermittelt
Zielzellen	APC und Effektor-T- Zellen	Effektor-Zellen	Effektor T-Zellen
Funktion	Suppression autoreaktiver T-Zellen	Mukosale Immunität, Toleranz gegenüber nicht-pathogenen Alloantigenen	Mukosale Immunität, Toleranz gegenüber nicht-pathogenen Alloantigenen, evtl. auch gegenüber Autoantigenen

APC = Antigen-präsentierende Zelle (engl. *antigen-presenting cell*); CD = *cluster of differentiation*; CD127 = Interleukin-7-Rezeptor-alpha; CD45RB = Isoform (*Splicing-Variante*) von CD45; CD49b = Integrin α -2; CTLA4 = zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen (engl.: *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*); FOXP3 = engl. *forkhead-box-protein P3*; GITR = engl. *glucocorticoid-induced TNFR-related protein*; hi = hohe (engl. *high*) Expression; IL = Interleukin; LAG 3 = engl. *Lymphocyte activation gene 3*; low = niedrige (engl. *low*) Expression; MALT = Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*); TGF- β = transformierender Wachstumsfaktor beta (engl.: *transforming growth factor beta*)

Häufig werden Treg als ein zweiseitiges Schwert beschrieben, da sie auch die Antwort gegen Tumorzellen unterdrücken und dadurch das Tumorstadium fördern (46). Ihre Funktion üben sie über verschiedene Mechanismen aus. Durch direkten Zellkontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen können sie die Präsentation von Autoantigenen verhindern. Sie inhibieren Effektorzellen über direkten Zellkontakt (36). Dadurch induzieren sie eine Herabregulation von Interleukin-(IL)-2 (47), unterdrücken die Differenzierung von autoreaktiven T-Effektorzellen (48) und hemmen die Proliferation von T-Effektorzellen (49). Außerdem wirken sie über die Sekretion anti-inflammatorischer Moleküle wie den transformierenden Wachstumsfaktor beta (engl.: *transforming growth factor beta*; TGF- β) und IL-10 (29, 50, 51).

1.4 Immunologie des Hirninfarkts

1.4.1 Pro-inflammatorische Phase des Hirninfarkts

Die zerebrale Ischämie geht mit einer Reihe von Ereignissen einher, die unmittelbar mit der Gefäßokklusion beginnt und zunächst zu einer lokalen Inflammation führt. Durch die Reduktion des zerebralen Blutflusses entsteht ein Mangel an Sauerstoff (Hypoxie) und Glukose, so dass die Neurone kein Adenosintriphosphat bilden können und absterben (8, 52). Normalerweise sind das zentrale Nervensystem (ZNS) und das periphere Immunsystem durch die Blut-Hirnschranke (BHS) streng getrennte Kompartimente. Die geschädigten Neurone übernehmen eine wichtige Funktion im Rahmen der immunologischen Geschehnisse im ZNS, da sie Alarmsignale abgeben (53) (siehe Abbildung 1). Mikroglia erkennen diese endogenen Alarmsignale (DAMPs: Schaden-assoziierte molekulare Muster (engl. *damage-associated molecular patterns*) über *Pattern-recognition*-Rezeptoren (z. B. Toll-like-Rezeptoren, Scavenger-Rezeptoren, *Nucleotide-binding-and-oligomerization-domain*-(NOD)-like-Rezeptoren) (52, 54). Sie migrieren zu dem geschädigten Gewebe und sezernieren proinflammatorische Zytokine und Sauerstoffmetabolite wie Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (55). Im Blutgefäß kommt es durch die Unterbrechung des Blutflusses zu Hypoxie, Scherkräften am Endothel und der Freisetzung von ROS. Die Hypoxie und freie Sauerstoffradikale setzen die Gerinnungskaskade in Gang, aktivieren das Komplementsystem sowie Thrombozyten und Endothelzellen. Es kommt innerhalb von Minuten nach Ischämie zu einer erhöhten Translokation von Adhäsionsmolekülen (z. B. interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (engl.: *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1), P-Selektine, E-Selektine) an die Oberfläche der Endothelzellen (56), wodurch den T-Zellen die Migration in das geschädigte Hirngewebe ermöglicht wird (57). Durch die Aktivierung sekundärer Botenstoffe (engl. *second-messenger*), dem Kalzium-Einstrom, der Zunahme freier Radikale und der Hypoxie werden pro-inflammatorische Gene verstärkt exprimiert. Dazu zählen die Gene des *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) (58), des Hypoxie-induzierten Faktors 1 (HIF-1) (59), des *Interferon regulatory factor 1* (IRF-1) (60) und des *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT 3) (61). Es kommt zu einer erhöhten Zytokin- (62) und Chemokin-Produktion (63). Durch das Vorhandensein proinflammatorischer Zytokine und Signalkaskaden der ROS, die Apoptose induzieren, kommt es zur erhöhten Permeabilität der BHS (54, 64) und zum Leukozyteneinstrom ins ZNS (57, 65).

Im perivaskulären Raum werden Mastzellen und Makrophagen aktiviert. Die Mastzell-Degranulation führt zur Ausschüttung von Histamin, Proteasen und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) (66). Aktivierte Makrophagen sezernieren weitere pro-inflammatorische Zytokine (67). Neurone, Mikroglia, Astroglia, Endothelzellen und periphere mononukleäre Blutzellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) tragen in der frühen postischämischen Phase ebenfalls zu einer Verstärkung der pro-inflammatorischen Signale bei. Splenozyten zeigten im Tiermodell eine vermehrte Sekretion von TNF- α , Interferon-gamma-(IFN- γ), IL-6 und IL-2 6 und 22 Stunden nach MCAO. Auch im ZNS konnte 6 Stunden nach induzierter Ischämie ein Anstieg dieser pro-inflammatorischer Zytokine gezeigt werden. (68).

Im Tiermodell zeigte sich im Gehirn ein Anstieg von T-Zellen am dritten Tag nach Reperfusion auf der ipsilateralen Seite nach MCAO (69). Die ersten T-Zellen wurden im ZNS bereits 24 Stunden nach MCAO nachgewiesen (70).

Verschiedene Arbeiten belegen das pro-inflammatorische Zytokinprofil in den ersten drei Tagen nach einer zerebralen Ischämie insbesondere bei Patienten mit einem schlechteren klinischen Verlauf (62, 68, 71-73).

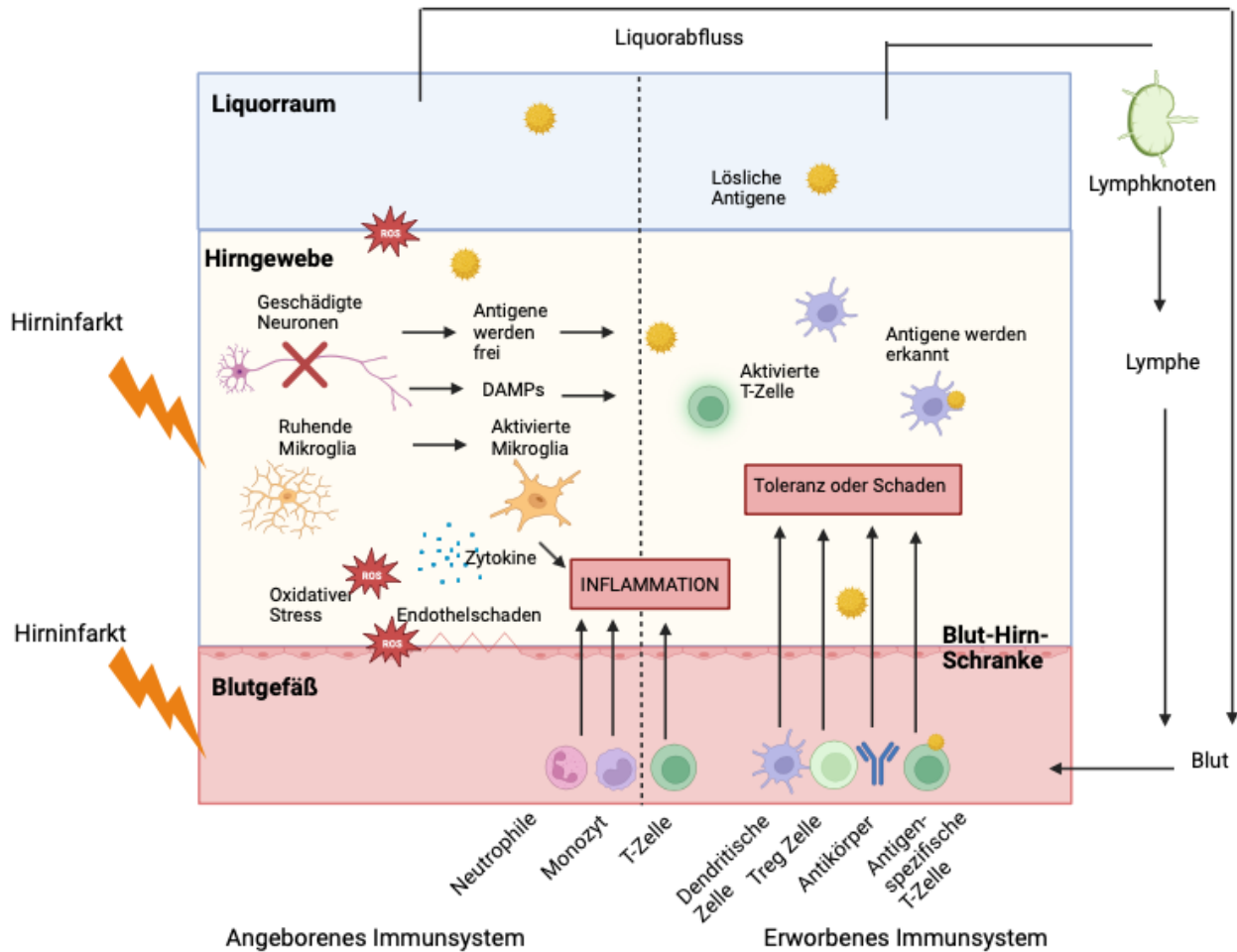


Abbildung 1: Reaktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems nach einem akuten Hirninfarkt (modifiziert nach Chamorro et al.) (54)
 DAMPs = Schaden-assoziierte molekulare Muster (engl. *damage-associated molecular patterns*); ROS = radikale Sauerstoffspezies (engl. *radical oxygen species*); TREG = regulatorische T-Zelle

1.4.2 Immunsuppressive Phase des Hirninfarkts (engl. *stroke induced immunodepression, SIID*) und die Rolle der Treg

Verschiedene Arbeiten belegen das regelhafte Auftreten einer systemischen Immunsuppression nach einem Hirninfarkt. Dies ist zum einen durch eine Beteiligung des sympathischen Nervensystems und der Hypothalamischen-Hypophysen-Nebennieren-Achse erklärbar. Durch Katecholamine und Glukokortikoide kommt es im Körper zu einer Hemmung der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch periphere T-Zellen, Monozyten und Makrophagen sowie zu einem Anstieg von IL-10-Sekretion. Außerdem kommt es durch die Ausschüttung von Noradrenalin sowohl im ZNS als auch in peripheren Organen wie der Nebenniere zum Vorherrschen eines immunsuppressiven Phänotyps in Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen (54, 74, 75). Bereits 1979 wies eine Arbeitsgruppe eine reduzierte Anzahl und Aktivität von T-Zellen innerhalb der ersten beiden

Tage nach einer akuten zerebralen Ischämie im peripheren Blut der Betroffenen nach (76). Ursächlich scheint hierfür eine gesteigerte Apoptose der Lymphozyten zu sein (77). Die Anzahl an T- und B-Zellen in der Milz fiel fünf Tage nach einem experimentell induzierten Hirninfarkt ab. Bereits 12 h nach der Ischämie kam es zu einer gesteigerten Apoptose von Lymphozyten in Milz, Thymus und im peripheren Blut (17). Nach einer MCAO zeigten die Mäuse im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen nach 96 h eine Milzatrophy (18). In einer weiteren klinischen Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patienten, die später einen Infekt entwickelten, einen stärkeren Abfall der CD4⁺-T-Zellen aufwiesen. Im Gegensatz dazu wiesen in der gleichen Studie Patienten, die keinen Infekt erlitten, höhere Absolutzahlen von CD4⁺CD25⁺ auf (78, 79). Die Funktion von T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1), welche in der Abwehr von bakteriellen Infektionen eine wichtige Rolle spielen, ist in der immunsuppressiven Phase des Hirninfarkts über eine verminderte Produktion von IFN- γ eingeschränkt (80). Auch das Zytokinprofil verändert sich zu Gunsten der anti-inflammatorischen Zytokine. Beispielsweise ist die Sekretion von IL-10 im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht (81). In einer klinischen Untersuchung zeigten Hirninfarkt-Patienten mit neurologischer Verschlechterung im Verlauf allerdings niedrigere IL-10-Spiegel als Patienten ohne neurologische Verschlechterung (82). Den Treg wird im ischämischen Hirninfarkt überwiegend eine protektive Rolle zugeschrieben. Das Infarktareal nach induziertem Hirninfarkt bei Mäusen war erheblich größer in den Tieren, in denen Treg zuvor durch anti-CD25 Antikörper depletiert wurden. Die gleichen Mäuse zeigten außerdem nach 7 Tagen ein schlechteres neurologisches Ergebnis und höhere Spiegel der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-1 β . Durch das Neutralisieren dieser Zytokine mit intracerebroventrikulär verabreichten Antikörpern, wurde das Infarktvolumen reduziert (83).

1.5 Statine und ihre Rolle in der Immunologie

Statine sind 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA)-Reduktase-Inhibitoren. Durch ihre Bindung an die HMG-CoA-Reduktase hemmen sie reversibel den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der intrazellulären Cholesterin-Biosynthese (84). Statine werden in der Primär- und Sekundärprophylaxe von Myokardinfarkten und ischämischen Schlaganfällen eingesetzt. Mehrere große Studien belegen die Effektivität von Statinen bei der Reduktion des Hirninfarkt- oder Herzinfarkttrisikos (85).

Dieser Effekt wurde zunächst durch die lipidsenkende Eigenschaft der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren erklärt. Später wurde jedoch gezeigt, dass Statine zusätzlich

inflammatorische Prozesse beeinflussen. Ein HMG-CoA-Reduktase-unabhängiger Effekt von Statinen ist die Bindung an das *Lymphocyte function-associated antigen* (LFA-1) auf Leukozyten, wodurch sich die Bindungskapazität des Interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (engl.: *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) ändert und die Lymphozyten-Migration gehemmt wird (86). Durch eine Blockade der L-Mevalonat-Synthese verhindern Statine die Entstehung relevanter Zwischenprodukte der Cholesterin-Biosynthese wie beispielsweise die Synthese der Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Diese Lipide sind wichtig für die posttranslationale Modifikation einer Vielzahl von G-Proteinen, darunter Ras, Rac und Rho (87). Eine Isoprenylierung verankert G-Proteine in der Zellmembran. Diese Verankerung ist für die Funktionalität der G-Proteine erforderlich, nur so können sie beispielsweise die Zellproliferation, -motilität, und -differenzierung steuern. Bei fehlender Isoprenylierung kommt es zur Anhäufung von inaktiven G-Proteinen im Zytosol (88). Die Folgen sind beispielsweise eine verminderte Expression von Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes II (engl.: *major histocompatibility complex II* MHC-II) (89) sowie eine reduzierte Expression und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen (90) und Chemokinen (91). Laut Studien kann Lovastatin die Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) im Serum um bis zu 15 % reduzieren (92, 93). Im Tiermodell der Multiplen Sklerose, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), wurde gezeigt, dass die Gabe von Atorvastatin sowohl therapeutische als auch präventive Effekte besitzt (94). Wir konnten darüber hinaus in einer Arbeit zeigen, dass auch spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen, sogenannte dendritische Zellen, durch Statine moduliert werden, die eine regulatorische T-Zell-Population induzieren (95).

Inzwischen wurde der positive immunmodulatorische Effekt von Statinen bei zahlreichen inflammatorischen Krankheitsbildern nachgewiesen. Dazu zählen die chronische obstruktive Lungenerkrankung (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) (96), die Hashimoto-Thyreoiditis (97), die *Myasthenia gravis* (98, 99), die Glomerulonephritis (100) und die *Graft-versus-Host-Disease* (101). Aufgrund der teilweise unzureichenden bzw. widersprüchlichen Datenlage sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig, um neue Therapiekonzepte für diese Krankheitsbilder zu etablieren.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der ischämische Hirninfarkt stellt in Deutschland und auch weltweit medizinisch und gesundheitspolitisch ein herausforderndes Krankheitsbild dar (1, 5). Die Prognose der Patientinnen und Patienten wird maßgeblich durch die Komplikationen nach einer zerebralen Ischämie bestimmt (16). Das Immunsystem weist nach einem Hirninfarkt deutliche Veränderungen auf. Da Treg die Immunantwort dämpfen, sind sie möglicherweise in der Lage den Schaden, der durch die Ischämie im zentralen Nervensystem (ZNS) entsteht, zu begrenzen. Gleichzeitig scheint der Organismus nach einem Hirninfarkt anfälliger für Infektionen, die zu ernsthaften Komplikationen führen können. Fraglich ist daher, ob dies durch Treg vermittelt sein könnte oder ein (Treg-) unabhängiger Effekt ist.

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Treg im peripher-venösen Blut von Hirninfarktpatienten und deren Korrelation zu klinischen und paraklinischen Parametern. Hierzu wurde eine Kombinationsfärbung mit verschiedenen Oberflächenmarkern (CD3+, CD4+, CD25hi, FoxP3+, CD127-) durchgeführt, um Treg mittels Durchflusszytometrie zu identifizieren.

Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

1. Wie gestaltet sich der zeitliche Verlauf der T-Lymphozyten-Gesamtpopulation und speziell der Treg nach einem ischämischen Hirninfarkt? Dazu erfolgten mehrere Blutentnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem ischämischen Ereignis.

Anschließend sollten mögliche Korrelationen zwischen dem zeitlichen Verlauf der T-Lymphozyten-Gesamtpopulation und Tregs und dem klinischen Verlauf (neurologischer Befund, Entwicklung des Gesundheitszustands), den auftretenden Komplikationen (Infektionen nach Hirninfarkt) und der medikamentösen Behandlung (Einnahme von Statinen vor und nach dem Hirninfarkt vs. nach dem Hirninfarkt) analysiert werden.

2. Gibt es eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Infektionen und der Anzahl der Treg bei Hirninfarktpatienten?
3. Hat die Einnahme von Statinen einen Einfluss auf die Anzahl der T-Zell-Gesamtpopulation und der Treg im peripheren Blut und ihren zeitlichen Verlauf?
4. Korreliert das klinische Ergebnis nach einem stattgehabten Hirninfarkt mit der Anzahl der Treg im peripheren Blut?

Eine bessere Kenntnis über den zeitlichen Verlauf der Treg könnte als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten dienen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Laborartikel

2.1.1 Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien sind in Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 2: Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien

Puffer, Lösung, Medium	Formel	Hersteller
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate-buffered saline, PBS)		PAA Laboratories, Österreich
Zellkulturmedium	Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640	Gibco In vitrogen, Karlsruhe
Einfriermedium	RPMI 1640 1 % Hepes 1M 40 % Fetales Kälberserum (FCS) hitzeinaktiviert für 30 min bei 56 °C	Gibco In vitrogen, Karlsruhe Gibco In vitrogen, Karlsruhe Biochrom, Berlin
Auftaumedium	RPMI 1640 1 % Hepes 1M 10 % FCS hitzeinaktiviert für 30 min bei 56 °C 100 U/ml Penicillin	Gibco In vitrogen, Karlsruhe Gibco In vitrogen, Karlsruhe Biochrom, Berlin Gibco In vitrogen, Karlsruhe
Waschmedium	RPMI 1640 1 % Hepes 1 M 5 % FCS hitzeinaktiviert für 30 min bei 56 °C 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Gibco In vitrogen, Karlsruhe Gibco In vitrogen, Karlsruhe Gibco In vitrogen, Karlsruhe Biochrom, Berlin Gibco Invitrogen, Karlsruhe
<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (FACS) Puffer	PBS 0,5 % bovines Serumalbumin 0,5 % Natriumazid (NaN ₃)	PAA Laboratories, Österreich Serva, Heidelberg Merck, Darmstadt
Humanes <i>forkhead-box-protein 3</i> (FoxP3)-Puffer Set		BD Biosciences, Heidelberg

2.1.2 Antikörper und Sekundärfarbstoffe

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper mit den für den Nachweis der Antigene genutzten Farbstoffen sind in Tabelle 3 gelistet.

Tabelle 3: Antikörper und Isotypen

Name	Klon	Herkunft	Konzentration
Antikörper zur Detektion von Oberflächenantigenen			
α -h-CD4-PerCP	SK3	BD Bioscience, Heidelberg	1:10
α -h-CD3-Alexa Fluor 700	UCHT1	BD Bioscience, Heidelberg	1:50
α -h- CD25-PE-Cy7	M-A251	BD Bioscience, Heidelberg	1:20
α -h-CD127-FITC	eBioRDR5	eBioscience, Frankfurt	1:10
α -h-CD45RA APC	HI100	BD Bioscience, Heidelberg	1:10
Antikörper zur Detektion intrazellulärer Antigene			
α -h-FoxP3-PE	259D/C7	BD Bioscience, Heidelberg	1:10
Sekundärantikörper, Isotypenkontrolle und Sonstige			
PE Isotyp IgG ₁ k	MOPC-21	BD Bioscience, Heidelberg	1 :10

Abkürzungen: α -h = anti-human; APC = Allophycocyanin; CD = *cluster of differentiation*; CD45RA = Isoform von CD45; Cy7 = Cyanin 7; FITC = Fluorescein-Isothiocyanat, FoxP3 = *forkhead-box-protein 3*; IgG = Immunglobulin G; PE = Phycoerythrin; PerCP = Peridin-Chlorophyll-Protein;

2.1.3 Sonstige Reagenzien und Chemikalien

Weitere in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 4 gelistet.

Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ficoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau (0,4 %)	Biochrom, Berlin

2.1.4 Kunststoffartikel und sonstige Materialien

Weitere in der vorliegenden Arbeit genutzten Materialien sind in Tabelle 5 gelistet.

Tabelle 5: Kunststoffartikel und sonstige Materialien

Artikel	Hersteller
Fluorescence activated cell sorting (FACS) Tubes	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon-Tubes	BD Biosciences, Heidelberg
Kryo-Tubes	Nunc, Roskilde, Dänemark
Pipettenspitzen bis 10 µl, 200 µl, 1000 µl	VWR, Darmstadt
Reaktionsgefäße (<i>safe lock tubes</i>)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland, Falcon
Blutentnahmeröhrchen Heparin 9ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland

2.1.5 Verwendete Software

Die in der vorliegenden Arbeit genutzte Software ist in Tabelle 6 gelistet.

Tabelle 6: Software

Software	Hersteller
FACS Diva	BD Bioscience, Heidelberg
Graphpad Prism 9	Graphpad Software Inc., USA
IBM SPSS Statistics 20 und 27	IBM
FlowJo 8.7.3	Tree Star Inc., USA

2.1.6 Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte sind Tabelle 7 gelistet.

Tabelle 7: Geräte

Gerät	Hersteller
Durchflusszytometer FACSCanto	BD Bioscience, Heidelberg
Eppendorf Centrifuge 5417R Heraeus Biofuge Primo R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Heraeus Kendro, Langenselbold
Inkubatoren	Heraeus Kendro, Langenselbold
Lichtmikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetischer Schüttler	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Multifuge 1 S	Heraeus Kendro, Langenselbold
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Pipetten	BD Biosciences, Heidelberg
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Herrenberg
Sterilbank, Herasafe Sterilbank	Heraeus Kendro, Langenselbold BDK Luft- und Raumtechnik, Sonnenbühl- Genkingen, Deutschland
Stickstofftank	Messer, Sulzbach
Vortexer	Scientific Industries, UK
Waage (für Chemikalien)	Mettler Gießen Deutschland
Wasserbad	Medingen, Wiesloch

2.2 Studienpopulation

Zwischen November 2007 und Juni 2008 wurden Patienten mit einem ischämischen Hirninfarkt oder einer transitorischen ischämischen Attacke (TIA) aus der Rettungsstelle des Helios Klinikum Berlin-Buch – ehemals Charité Universitätsmedizin Berlin Campus Berlin-Buch – für die prospektive Fallserie rekrutiert. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité evaluiert und genehmigt (Ethikvotum EA1/199/07). Es erfolgte eine Aufklärung der Patienten und anschließend eine schriftliche Einwilligung gemäß der Prinzipien der Deklaration von Helsinki. Im Falle einer fehlenden Einwilligungsfähigkeit des Patienten wurde ein gesetzlich bestellter Betreuer aufgeklärt.

Zu den Einschlusskriterien zählten:

- Aufnahme maximal 8 h nach Auftreten der Symptome
- Alter >30 Jahre
- komplette zerebrale Ischämie oder transitorische ischämische Attacke (TIA)

Zu den Ausschlusskriterien zählten:

- vorausgegangene zerebrale Ischämie in den letzten 12 Monaten
- mehr als zwei ischämische Schlaganfälle in der Anamnese
- Diabetes mellitus Typ 1
- Autoimmunerkrankung
- vorausgegangene Operation in den letzten 3 Monaten
- immunsuppressive Therapie

2.3 Studienprotokoll

Bei den in die Studie aufgenommenen Patienten waren Blutentnahmen für folgende Zeitpunkte vorgesehen:

- bei Aufnahme
- Nach 24 h \pm 4 h
- nach 48 h \pm 8 h
- nach 72 h \pm 12 h
- nach 5 d \pm 60 h
- nach 5 Wochen \pm 1 Woche; diese Blutentnahmen fanden im häuslichen Umfeld der Patienten oder in den weiterbehandelnden Rehabilitationskliniken/Geriatriischen Kliniken statt.

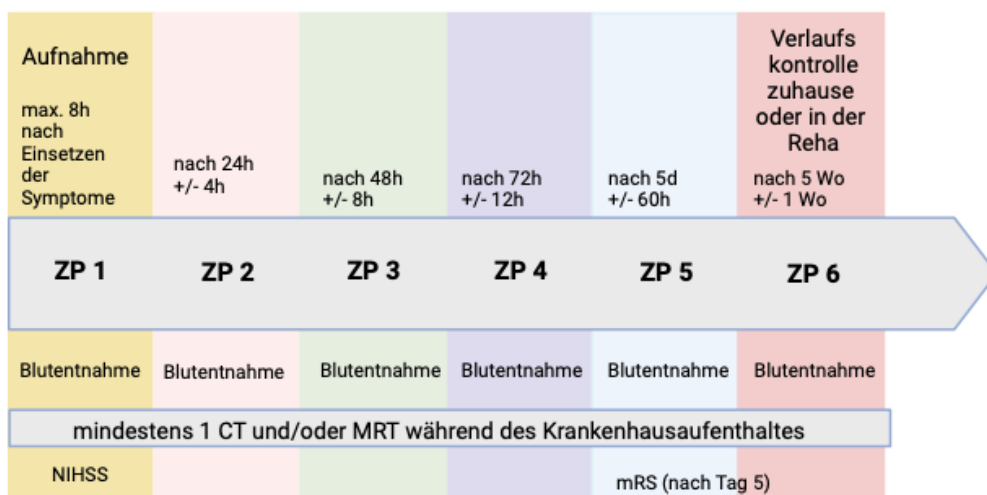


Abbildung 2: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Untersuchung

Das entnommene Blutvolumen pro Zeitpunkt betrug ca. 16 ml (2-3 Sarstedt Heparin-Röhrchen).

Für den klinischen Nachweis eines Hirninfarkts wurden folgende etablierte Scores verwendet:

- National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS)
- modifizierte Rankin-Skala (mRS)

Tabelle 8: NIHSS

Parameter	Bewertung	Punkte
Vigilanz	wach – benommen – somnolent - komatös	0 bis 3
Orientierung (Frage nach Alter und Monat)	beide Antworten richtig - eine richtig - keine richtig	0 bis 2
Befolgen von Aufforderungen (Öffnen und Schließen der Augen sowie der nicht-paretischen Hand)	beide Aufforderungen ausgeführt - eine ausgeführt - keine ausgeführt	0 bis 2
Okulomotorik	Normalbefund- partielle Blickparese - komplette Blickparese oder forcierte Blickdeviation	0 bis 2
Gesichtsfeld	keine Einschränkung - partielle Hemianopsie - komplette Hemianopsie - bilaterale Hemianopsie	0 bis 3
Fazialisparese	keine - gering - partiell - vollständig	0 bis 3
Motorik der Arme (Arme halten bei 90°)	kein Absinken - Absinken innerhalb von 10 Sekunden - Anheben gegen Schwerkraft möglich - kein Anheben möglich - keine Bewegung	0 bis 4
Beinmotorik (Beine halten bei 30°)	kein Absinken - Absinken innerhalb von 5 Sekunden - Anheben gegen Schwerkraft möglich - kein Anheben möglich - keine Bewegung	0 bis 4
Ataxie der Extremitäten	keine - an einer Extremität - an beiden Extremitäten	0 bis 2
Sensibilität	normal - leicht bis mittelschwerer Verlust - schwerer bis vollständiger Verlust	0 bis 2
Sprache	normal - leichte bis mittelschwere Aphasie- schwere Aphase - globale Aphasie oder stumm	0 bis 3
Dysarthrie	keine - leicht bis mittelschwer - schwer	0 bis 2
Neglect	keiner - visuell, taktil, auditiv oder personenbezogen - Schwer halbseitig oder halbseitig in mehr als einer Qualität	0 bis 2

Tabelle 9: mRS

Wert	Klinischer Befund
0	Keine Funktionseinschränkung
1	Keine wesentliche Funktionseinschränkung. Kann trotz geringer neurologischer Defizite uneingeschränkt Alltagsaktivitäten verrichten.
2	Geringe Funktionseinschränkung. Kann sich ohne Hilfe versorgen, ist aber im Alltag eingeschränkt.
3	Mäßige Funktionseinschränkung. Benötigt Hilfe im Alltag, kann aber ohne fremde Hilfe bzw. mit Hilfsmitteln (Gehstock, Rollator) gehen.
4	Mittelschwere Funktionseinschränkung. Benötigt Hilfe bei der Körperpflege, kann nicht ohne Hilfe gehen.
5	Schwere Funktionseinschränkung. Bettlägerig, inkontinent, benötigt ständige pflegerische Hilfe.
6	Tod

Jeder Patient erhielt mindestens ein Computertomogramm (CT) oder Magnetresonanztomogramm (MRT) bei der Aufnahme. Vereinzelt wurden auch Verlaufskontrollen durchgeführt, sofern sie klinisch indiziert waren.

Weiter wurde insbesondere auf klinische Anzeichen einer Pneumonie und eines Harnwegsinfektes geachtet. Die Diagnose eines Infektes wurde mit Hilfe der klinischen und paraklinischen Parameter durch den behandelnden Arzt gestellt.

Zur Charakterisierung des Studienkollektivs wurden folgende Daten dokumentiert:

- Alter (Jahre)
- Geschlecht (weiblich/männlich)
- Hirninfarkt-Typ (kardioembolisch/lakunär/artherosklerotisch/transitorische ischämische Attacke (TIA))
- Bildgebungsbefund (positiv/negativ)
- *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS) bei Aufnahme (<16/≥ 16)
- Klinische Entwicklung des Gesundheitszustands (mRS nach Tag 5; 0,1,2,3/4,5,6)
- Statin-Medikation (ohne/vor und nach dem Hirninfarkt/nach dem Hirninfarkt)
- Lyse-Therapie (ja/nein)
- Klinischer Infekt (ja/nein)
- Maximaler Wert des C-reaktiven Proteins (CRP) (> 10 mg/l/≤ 10 mg/l)
- Rezidiv (ja/nein)
- Entlassungsart (nach Hause/Rehabilitation/andere Abteilung/Pflegeheim/Tod)

2.4 Zellbiologische Methoden

Alle Materialien, die in Kontakt mit dem Blut oder den Zellen kamen, wurden sterilisiert. Beim Umgang mit den Zellen wurde unter einer Sterilbank gearbeitet, die regelmäßig mit Ethanol desinfiziert und mit ultraviolettem (UV) Licht bestrahlt wurde.

2.4.1 Isolierung von PBMC aus Heparin-Blut – Dichtegradientenzentrifugation

Die ca. 16 ml Heparin-Blut der Patienten zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden in ein 50 ml Reagenzgefäß gefüllt und auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. In zwei separaten Reagenzgefäßen wurde je 15 ml Ficoll vorgelegt. Das verdünnte Heparin-Blut wurde dann zu gleichen Teilen auf die beiden Gefäße mit Ficoll aufgeteilt. Dabei wurde darauf geachtet, das Ficoll mit dem Blut zu überschichten und nicht zu mischen, so dass zwei Phasen entstanden. Die Proben wurden bei 764 g 25 min ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der entstandene Lymphozyten-Ring wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen, auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 561 g 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 30 ml PBS bei 389 g für 15 min bei Raumtemperatur und anschließend ein Thrombozyten-Waschschrift bei 200 g für 15 min bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden abschließend in 10 ml Waschmedium aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurden die vitalen Zellen in 16 Feldern eines Quadrats ausgezählt (n). Die vitalen Zellen zeichneten sich dadurch aus, dass sie kein Trypanblau aufgenommen hatten und im Lichtmikroskop hell erschienen. Die Gesamtzahl der Zellen ergab sich wie folgt: Gesamtzahl = $n \times 2$ (Verdünnungsfaktor) $\times 10$ (Volumen) $\times 10^4$. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen in 500 µl Einfriermedium pro ca. 10 Millionen Zellen aufgenommen und je Probe mit 500 µl 20 % Dimethylsulfoxid-(DMSO)-Lösung versetzt. Die Proben wurden für 24 h langsam bei -80°C gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff überführt, wo sie bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence activated cell sorting*, FACS) wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, die Expression von Oberflächenmolekülen sowie des

intrazellulären Transkriptionsfaktors FoxP3 zu bestimmen. Beim FACS wird die Streuung eines Laserstrahles an den Strukturen der Zellen genutzt, um die Größe und Granularität der Zellen zu ermitteln. Weiter lassen sich mit Fluoreszenz-Farbstoffen konjugierte Antikörper verwenden, um Antigene der Zellen nachzuweisen. Diese Farbstoffe werden als Fluorochrome bezeichnet. Bei der Fluoreszenz absorbieren Moleküle Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren Licht einer anderen Wellenlänge. Die Intensität des emittierten Lichtes ist dabei proportional zur Menge der angeregten Fluorchrommoleküle und damit zum Ausmaß der Expression der an den konjugierten Antikörper gebundenen Antigene. Aufgrund der Existenz verschiedener Fluorochrome (z. B. Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP)), deren Emissionsbereiche sich nur teilweise überlappen, ist es möglich, verschiedene Moleküle auf der Oberfläche bzw. im Zytoplasma der Zellen anzufärben. Beim FACS werden die nachzuweisenden Moleküle auf oder in der Zelle mit primären Antikörpern spezifisch markiert, die im einfachen Fall direkt an das Fluorchrom gebunden sind. Zur Messung der Streuung und Fluoreszenz wurde ein FACSCanto II Gerät verwendet. Die Zellen werden hierbei einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an drei Lasern vorbeigeleitet (405 nm Diodenlaser, 30 mW; 488 nm Diodenlaser, 20 mW; 633 nm Helium-Neon-Laser, 17 mW). Das gestreute und emittierte Licht wird nach der Passage von optischen Linsen, Spiegeln, Filtern und Photodetektoren in ein elektrisches Signal verwandelt, das mit Hilfe eines Computers graphisch und statistisch ausgewertet wird. Der FACSCanto II ermöglicht die parallele Bestimmung von bis zu zehn Parametern. In der vorliegenden Arbeit wurden acht Parameter bestimmt (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Messparameter am FACS Canto II

Parameter	Nachweis	Absorptions- maximum (nm)	Emissions- maximum (nm)	Zielstruktur
Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward-scatter</i> , FSC)	Streuung längs des Laserstrahls			Zellgröße
Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i> , SSC)	Streuung quer zum Laserstrahl			Granularität
Fluoreszenz 1	Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	494	519	CD127
Fluoreszenz 2	Phycoerythrin (PE)	496, 564	578	FoxP3
Fluoreszenz 3	Allophycocyanin (APC)	650	660	CD45RA
Fluoreszenz 4	Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP)	482	678	CD4
Fluoreszenz 5	Alexa Fluor 700	696	719	CD3
Fluoreszenz 6	Phycoerythrin/Cyanin 7 (PE-Cy7)	496, 564	785	CD25

2.5.2 Nachweis von Oberflächenproteinen

Die bei -80°C gelagerten PBMC-Proben wurden aufgetaut und in Waschmedium gewaschen und erneut gezählt. Pro Patient und Zeitpunkt wurden $2-4 \times 10^6$ PBMC verwendet. Jeweils $1-2 \times 10^6$ PBMC wurden in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in der angefertigten Mischung mit dem Primärantikörper (antiCD-3-Alexafluor700, antiCD4-PerCP, antiCD25-PE-Cy7, antiCD127-FITC und antiCD45RA-APC, siehe Tabelle 3) resuspendiert und für 30 min in den angegebenen Konzentrationen in einem Volumen von 100 μl bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Färbung der intrazellulären Proteine (siehe Kapitel 2.5.3). Alle Arbeitsschritte bei der Färbung der Oberflächenantigene erfolgten auf Eis und in einer gekühlten Zentrifuge (4°C , 4 min, 550 *relative centrifugal force* (rcf)).

2.5.3 Intrazelluläre FoxP3-Färbung

Zur Anfärbung intrazellulärer Strukturen müssen die Antikörper die Zellmembran passieren. Daher werden die Zellen vor der Färbung intrazellulärer Antigene fixiert und permeabilisiert. Für diese Arbeitsschritte wurde das FoxP3-Puffer-Set nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Nach erfolgter Fixierung und Permeabilisierung sowie zweimaligem Waschen wurde jeweils die Hälfte der Probe mit einem FoxP3-Antikörper (antiFoxP3-PE) bzw. mit

einem Isotyp-Kontrollantikörper (anti mouse IgG1-PE) für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Isotyp-Kontrolle erfolgte, um eine eventuelle unspezifische Bindung des spezifischen Antikörpers zu detektieren. Daher wurde ein Antikörper der gleichen Klasse (IgG1) mit dem gleichen Fluorchrom verwendet, der spezifisch an ein nicht in der Zelle vorkommendes Antigen bindet. Nach abschließendem zweimaligen Waschen wurden die Zellpellets in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und am FACSCanto II analysiert. Alle Arbeitsschritte der Färbung des intrazellulären Transkriptionsfaktors FoxP3 erfolgten bei Raumtemperatur. Für die Waschschrte wurden die PBMC 7 min bei 1000 rcf zentrifugiert.

2.5.4 Analyse

Standardmäßig wurden Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität im *Forward-Scatter*-(FSC)-*Side-Scatter*-(SSC)-Bild identifiziert. Die Daten wurden im FACS Diva Standard aufgezeichnet und anschließend mittels der Software Flo Jo analysiert.

Bestimmt wurden folgende Subpopulationen (Anzahl pro µl Patientenblut):

- CD3⁺-Lymphozyten (T-Zellen)
- CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten (T-Helferzellen)
- CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺-Lymphozyten (Treg – Markerkombination 1)
- CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺CD127-Lymphozyten (Treg – Markerkombination 2)

Aus den FACS-Daten wurden weiter folgende Anteile (%) bestimmt:

- Anteil der CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten an allen CD3⁺-Lymphozyten
- Anteil der CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺-Lymphozyten an allen CD4⁺-Lymphozyten
- Anteil der CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺CD127-Lymphozyten an allen CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺-Lymphozyten

Falls keine Angabe zur abgenommenen Blutmenge vorhanden war, wurden die im Protokoll vorgesehenen 16 ml vorausgesetzt. Bei einer dokumentierten abweichenden Blutmenge wurde diese berücksichtigt.

2.6 Erhebung der klinischen Parameter für die Korrelationsanalyse

Nachweis von Infektionen: Es wurden klinische Auffälligkeiten und paraklinische Befunde (Entzündungszeichen im Blut, Befunde der Bildgebung und mikrobiologische Befunde) berücksichtigt. Die Entscheidung, ob ein Infekt vorlag und ob oder wie dieser behandelt wurde, lag bei den behandelnden Ärztinnen und Ärzten.

Statin-Therapie: Die Information, ob ein Patient bereits vor dem ischämischen Ereignis ein Statin einnahm, wurde der Krankenakte entnommen. Bei auffälliger Lipiddiagnostik nach stattgehabtem Hirninfarkt wurde leitliniengemäß eine Statintherapie begonnen. Die Indikationsstellung zur Therapie und die Auswahl des Statins erfolgte durch die behandelnden Stationsärzte.

Outcome-Analyse mit dem mRS: Der mRS wurde verwendet, um das funktionale neurologische Outcome zu messen. Die Werte 0, 1, 2 und 3 wurden als „gutes klinisches Ergebnis“ zusammengefasst. Die Werte 4, 5 und 6 wurden als „schlechtes klinisches Ergebnis“ zusammengefasst.

2.7 Statistik

Es erfolgte eine statistische Beratung und Prüfung der Ergebnisse durch das Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf. Sämtliche statistische Analysen wurden mittels IBM SPSS Statistics 20 durchgeführt. Alle Analysen waren zweiseitig mit einem Alpha von $p < 0,05$. Eine Normalverteilung der Daten wurde vorausgesetzt.

Um zu analysieren, ob ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Treg und dem Auftreten eines Infektes besteht sowie ob ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Treg und der Einnahme von Statinen besteht, wurde ein lineares, gemischtes Modell mit der eingeschränkten Maximum-Likelihood Methode (REML) verwendet. Zur Feststellung der Signifikanz wurde der Test auf feste Effekte durchgeführt. Dargestellt wurden die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle aus dem Modell. Es wurde berücksichtigt, dass es sich bei der Untersuchung um Messwiederholungen handelt. Zur Analyse eines potenziellen Zusammenhangs zwischen der Anzahl der Treg und dem Outcome wurde eine logistische Regression durchgeführt. Das Outcome wurde mit der mRS ermittelt. Für die statistische Analyse wurden die Outcome-Klassen dichotomisiert. Die mRS-Werte, die „keiner Funktionseinschränkung“, „keiner wesentlichen Funktionseinschränkung“, einer „geringen Funktionseinschränkung“ und einer „mäßigen Funktionseinschränkung“ entsprechen, wurden als „gutes klinisches Ergebnis“ zusammengefasst. Die mRS-Werte die als „mittelschwere Funktionseinschränkung“, „schwere Funktionseinschränkung“ und „Tod“ klassifiziert wurden, wurden als „schlechtes klinisches Ergebnis“ gewertet. Die Grafiken wurden mit dem Graphpad Prism 9 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Zunächst wurden die in die Untersuchung eingeschlossenen 59 Patientinnen und Patienten hinsichtlich ihres Alters und Geschlechts, der Charakteristika des Hirninfarkts und des klinischen Verlaufs analysiert (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Charakteristika der Studienpopulation (n=59)

Alter (Jahre) Mittelwert ± Standardabweichung Jüngster Patient/Ältester Patient		73,5 ±11,5 41/95	
Parameter	Ausprägung	n	Gültige %*
Geschlecht	weiblich	27	45,8
	männlich	32	54,2
	<i>fehlende Werte</i>	0	
Hirninfarkt-Typ	kardioembolisch	30	55,6
	lakunär	4	7,4
	arteriosklerotisch	15	27,8
	transitorische ischämische Attacke (TIA)	5	9,3
	<i>fehlende Werte</i>	5	
Bildgebungsbefund	positiv	45	78,9
	negativ	12	21,1
	<i>fehlende Werte</i>	2	
<i>National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) bei Aufnahme</i>	<16	11	22
	≥16	39	78
	<i>fehlende Werte</i>	9	
Modifizierte Rankin-Skala (mRS) nach Tag 5	Gutes klinisches Ergebnis (Werte 0,1,2,3)	30	57,7
	Schlechtes klinisches Ergebnis (Werte 4,5,6)	22	42,3
	<i>fehlende Werte</i>	7	
Statin-Medikation	Ohne	19	35,2
	vor und nach dem Hirninfarkt	14	25,9
	nur nach dem Hirninfarkt	21	38,9
	<i>fehlende Werte</i>	5	
Lyse	ja	8	13,6
	nein	51	86,4
	<i>fehlende Werte</i>	0	
Klinischer Infekt	ja	21	35,6
	nein	38	64,4
	<i>fehlende Werte</i>	0	
C-reaktives Protein (CRP) Maximum	>10 mg/l	33	57,9
	≤ 10 mg/l	24	42,1
	<i>fehlende Werte</i>	2	
Rezidiv	ja	16	30,2
	nein	37	69,8
	<i>fehlende Werte</i>	6	

Alter (Jahre) Mittelwert \pm Standardabweichung Jüngster Patient/Ältester Patient		73,5 \pm 11,5 41/95	
Parameter	Ausprägung	n	Gültige %*
Entlassungsart	nach Hause	18	31
	Rehabilitation	27	46,6
	Andere Abteilung	4	6,9
	Pflegeheim	3	5,2
	Tod	6	10,3
	<i>fehlende Werte</i>	1	

*) Der 'gültige Prozentsatz' klammert bei der Berechnung der relativen Häufigkeiten die fehlenden Werte aus.

Die Patienten waren durchschnittlich 73,5 \pm 11,5 Jahre alt. Es waren etwas mehr Männer (n=32) betroffen als Frauen (n=27). Der häufigste Hirninfarkt-Typ war der kardioembolische Hirninfarkt (n=30). Bei 35 % der Patienten wurde ein Infekt diagnostiziert. Knapp ein Drittel der Patienten konnte im Anschluss an die Behandlung im Krankenhaus nach Hause entlassen werden. 60 % wurden in eine Einrichtung verlegt (Rehabilitations, andere Abteilung, Pflegeheim). 10 % der Patienten verstarben.

3.2 Nachgewiesene Subpopulationen in der Durchflusszytometrie

Zur Beurteilung des Einflusses eines Hirninfarktes bzw. des Auftretens einer Hirninfarkt assoziierten Infektion oder Statin-Therapie auf das Immunsystem wurden verschiedene Immunzellpopulationen betrachtet. Der Schwerpunkt lag auf Subpopulationen der CD3+CD4+-T-Zellen. Die folgende Abbildung 3 zeigt die mithilfe der FACS-Analyse identifizierten Subpopulationen:

- CD3+-Lymphozyten
- CD3+CD4+-Lymphozyten
- CD3+CD4+CD25hiFoxP3+-Lymphozyten
- CD3+CD4+CD25hiFoxP3+CD127--Lymphozyten

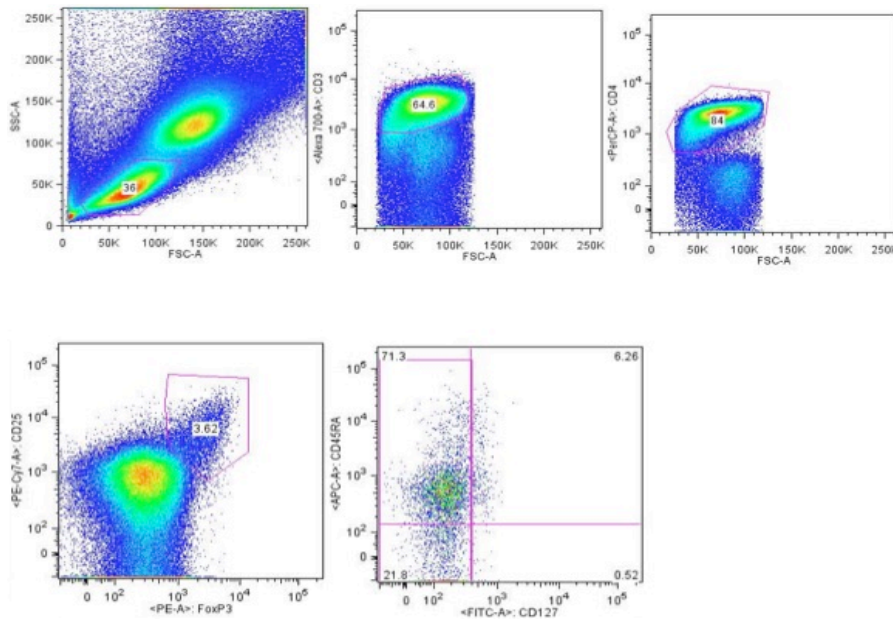


Abbildung 3: Durchflusszytometrische Analyse der peripheren mononukleären Blutzellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC)
 Obere Reihe: Nachweis von Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität (links); Nachweis von T-Zellen anhand CD3-Expression (Mitte); Nachweis von T-Helferzellen anhand der CD4-Expression (rechts); Untere Reihe: Nachweis von CD4+CD25hiFoxP3+ T-Zellen (links), Nachweis von CD4+CD25+CD127--T-Zellen (Mitte)
 Abkürzungen: APC = Allophycocyanin; CD = *cluster of differentiation*; Cy7 = Cyanin 7; FITC = Fluorescein-Isothiocyanat; FoxP3 = *forkhead-box-protein 3*; FSC = *forward-scatter*; PE = Phycoerythrin; PerCP = Peridin-Chlorophyll-Protein; SSC = *side-scatter*

Es wurden ausschließlich T-Zellen betrachtet, die anhand ihres Oberflächenmarkers CD3 identifiziert wurden. Im weiteren Verlauf wird daher der Marker CD3+ nicht mehr erwähnt bei der Beschreibung der Subpopulationen.

3.3 Zeitlicher Verlauf von CD4+-T-Zellen und von Treg bei Hirninfarkt-Patienten

Die Analyse der CD4+-T-Zellen (siehe Abbildung 4A) und der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen (Treg, siehe Abbildung 4B) der Hirninfarkt-Patienten der Studienpopulation ergab keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf.

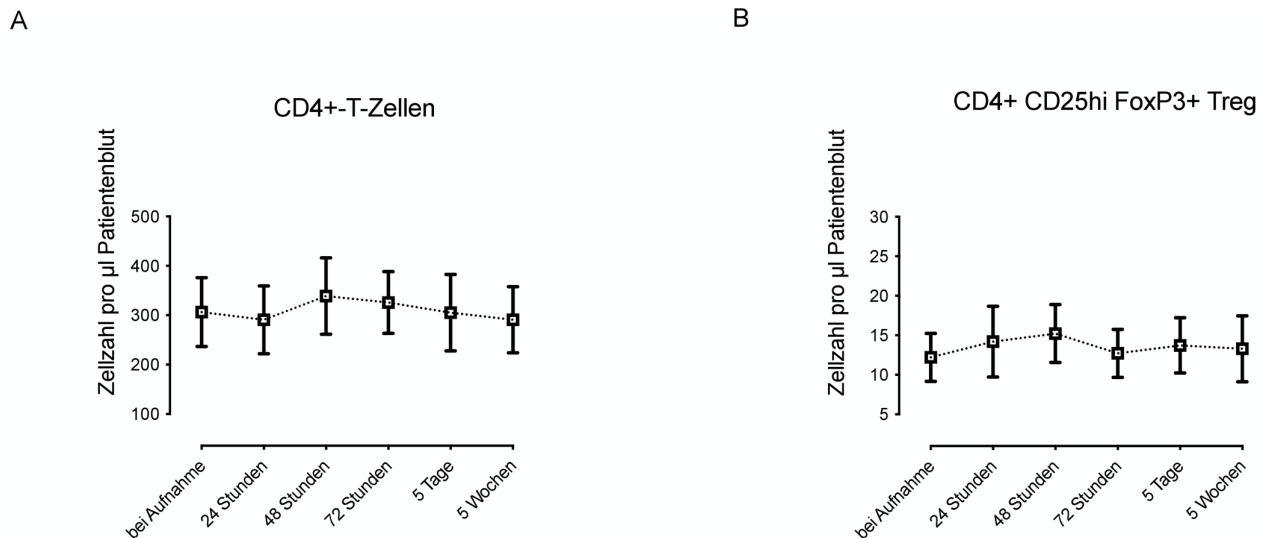


Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Anzahl von CD4+-T-Zellen (A) und CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen (Treg; B) im Blut von Hirninfarktpatienten (n=59). Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle.
Abkürzungen: CD = cluster of differentiation; FoxP3 = forkhead-box-protein

3.4 Vergleich der Lymphozyten-Zahlen bei Patienten mit und ohne Infekt

35,6 % (n= 21) der Patienten zeigten klinisch und paraklinisch einen Infekt. Von diesen Patienten entwickelten 76,2 % (n=16) eine Pneumonie (n=7 mit Dysphagie), 14,3 % (n=3) einen Harnwegsinfekt, 4,8 % (n=1) einen Herpes zoster, 4,8 % ein Erysipel (n=1) und 4,8 % (n=1) einen Infekt mit unklarem Fokus. Bei einem Patienten wurde eine Pneumonie und ein Harnwegsinfekt diagnostiziert. Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt der untersuchten T-Zell-Subpopulationen und ihr zeitlicher Verlauf bei Hirninfarktpatienten mit und ohne Infekt.

CD4+-T-Zellen und Treg bei Patienten mit und ohne Infekt (Gesamtauswertung)

Die Patienten mit Infekt zeigten im Mittel aller Zeitpunkte signifikant niedrigere CD4+-T-Zellzahlen ($p=0,046$; siehe Abbildung 5A) und CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellzahlen ($p=0,035$; siehe Abbildung 5C) im Vergleich zu den Patienten ohne Infekt. Der relative Anteil der CD4+-T-Zellen an den CD3+-T-Zellen war bei Patienten mit Infekt ebenfalls erniedrigt; der Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Infekt war jedoch nicht signifikant ($p=0,153$; siehe Abbildung 5B). Ebenso war auch der relative Anteil der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen an allen CD4-T-Zellen bei Patienten mit Infekt niedriger, allerdings ohne eine statistische Signifikanz ($p=0,455$; siehe Abbildung 5D). Auch die absolute Anzahl der CD3+CD4+CD25hiFoxP3+CD127- -T-Zellen pro µl Blut war bei Patienten mit Infekt erniedrigt; wobei wiederum kein signifikanter Unterschied zu den

Werten der Patienten ohne Infekt bestand ($p=0,093$; siehe Abbildung 5E). Bei Betrachtung der Prozente aus der FACS-Auswertung zeigte sich in dieser Zellpopulation dieser Effekt allerdings nicht ($p=0,7$; Abbildung 5F).

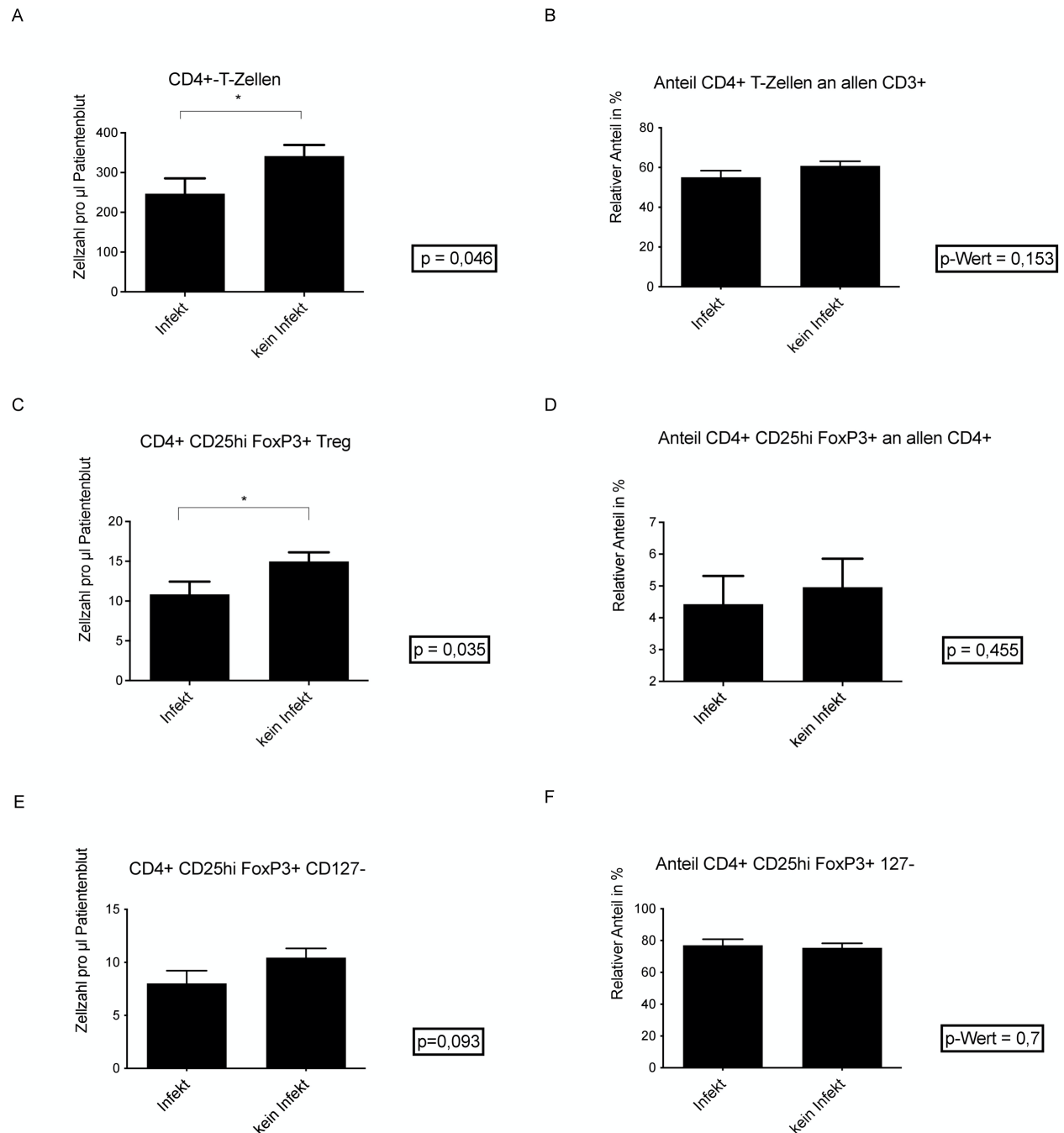


Abbildung 5: Vergleich der T-Zellsubpopulationen bei Hirninfarktpatienten mit ($n=21$) und ohne ($n=38$) Infekt. Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle. A: Anzahl der CD4+-T-Zellen; B: relativer Anteil der CD4+-T-Zellen an allen CD3+-T-Zellen; C: Anzahl der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen; D: Relativer Anteil der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen; E: Anzahl der CD3+CD4+CD25hiFoxP3+CD127--T-Zellen; F: Relativer Anteil der CD4+CD25hiFoxP3+CD127-T-Zellen
Abkürzungen: CD = *cluster of differentiation*; FoxP3 = *forkhead-box-protein*; * = $p < 0,05$ signifikanter Effekt

CD4+-T-Zellen und Treg bei Patienten mit und ohne Infekt (zeitlicher Verlauf)

Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der T-Lymphozyten-Populationen der Patienten mit und ohne Infekt ergab einen signifikanten Unterschied beim relativen Anteil (in %) der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen (Treg) an allen CD4+-T-Zellen zwischen den einzelnen Zeitpunkten bei Patienten ohne Infekt. In dieser Gruppe stieg der Anteil der Treg bis zum Zeitpunkt 2 (24 h nach Einsetzen der Symptome) an, fiel danach ab und erreichte am Zeitpunkt 4 (72 h nach Einsetzen der Symptome) ein Minimum, um anschließend wieder zu steigen (siehe Abbildung 6D). Bei den Patienten mit Infekt bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten. Weiter zeigten Patienten mit und ohne Infekt keine signifikanten Unterschiede zueinander beim Anteil der CD4+CD25hiFoxP3+-Zellen (Treg) an den CD4+-T-Zellen zu den verschiedenen Messzeitpunkten (siehe Abbildung 6D). Bei den anderen betrachteten Zellpopulationen bestanden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Infekt (siehe Abbildung 6A–C und 5E–F). Die Zellzahlen der CD4+-T-Zellen (siehe Abbildung 6A), der CD4+CD25hiFoxP3+-Zellen (siehe Abbildung 6C), der CD4+CD25hiFoxP3+CD127Zellen (siehe Abbildung 6E) und sanken jedoch jeweils zum Zeitpunkt 4 (72 h nach Symptombeginn) bei Patienten ohne Infekt ab, wobei diese Veränderung nicht statistisch signifikant war. Die Anzahlen der CD4+CD25hiFoxP3+-Zellen (siehe Abbildung 6B) und der CD4+CD25hiFoxP3+CD127--T-Zellen (siehe Abbildung 6C) stiegen danach wieder an, wohingegen die Anzahl aller CD4+-Zellen weiter abfiel (siehe Abbildung 6E). Bei Patienten mit nachgewiesenem Infekt sanken sowohl die absoluten Zellzahlen als auch die relativen Anteile der CD4+CD25hiFoxP3+-Zellen (siehe Abbildung 6C+D) an allen CD4+-Zellen und der CD4+CD25hiFoxP3+CD127--T-Zellen (siehe Abbildung 6E+F) vom Zeitpunkt 1 (bei Aufnahme) zum Zeitpunkt 2 (nach 24 h) ab. Bei den CD4+-T-Zellen war nur ein Abfall der absoluten Zellzahl pro μl Blut zu erkennen (Abbildung 6A+B). Diese Veränderungen waren statistisch nicht signifikant.

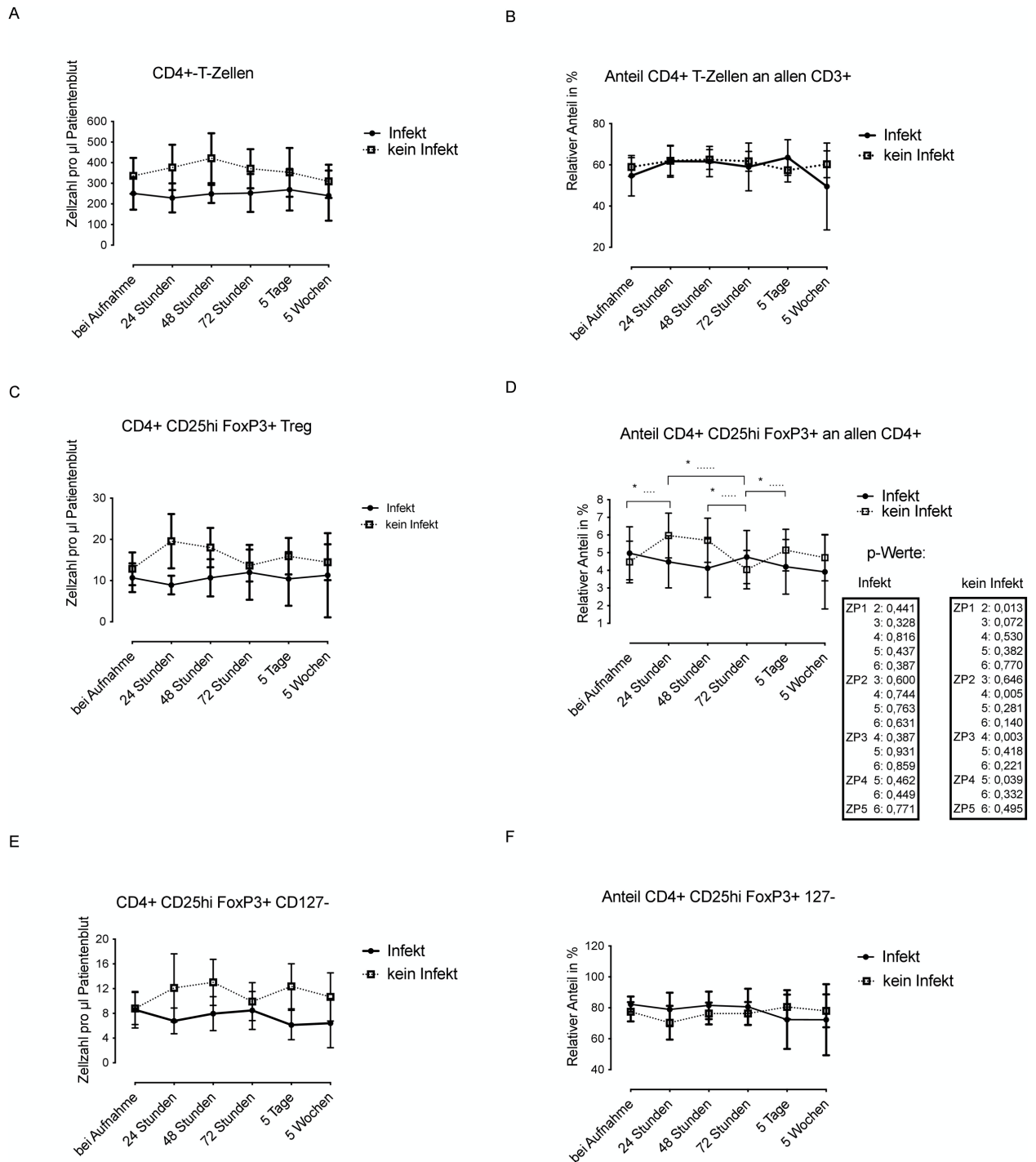


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der T-Zell-Subpopulationen bei Hirninfarkt-Patienten mit (n=21) und ohne (n=38) Infekt. Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle.

A: Anzahl der CD4+-T-Zellen; B: relativer Anteil der CD4+-T-Zellen an allen CD3+-T-Zellen; C: Anzahl der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen; D: Relativer Anteil der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen; E: Anzahl der CD3+CD4+CD25hiFoxP3+CD127--T-Zellen; F: Relativer Anteil der CD4+CD25hiFoxP3+CD127--T-Zellen.

Abkürzungen: CD = cluster of differentiation; FoxP3 = forkhead-box-protein; * = p<0,05 signifikanter Effekt

3.5 Vergleich der Lymphozyten-Zahlen bei Patienten mit und ohne Statin-Therapie

32,2 % (n= 19) der Patienten nahmen weder vor noch nach dem Hirninfarkt während der Dauer der Untersuchung ein Statin ein. Bei 23,7 % (n=14) der Patienten wurde schon zum Zeitpunkt des Hirninfarkts eine Statin-Therapie durchgeführt. 35,6 % (n=21) der Patienten erhielten im Rahmen der Hirninfarkt-Behandlung ein Statin bei nachgewiesener Hyperlipoproteinämie. Dargestellt werden im Folgenden die Ergebnisse der untersuchten T-Zell-Subpopulationen und ihr zeitlicher Verlauf bei Hirninfarkt-Patienten mit Statin-Therapie vor und nach dem Hirninfarkt, nur nach dem Hirninfarkt und ohne Statin-Therapie.

CD4+-T-Zellen und Treg bei Patienten mit und ohne Statin-Therapie (Gesamtauswertung)

In der Durchflusszytometrie ergab sich ein signifikanter Unterschied beim relativen Anteil der CD4+CD25hiFoxP3+-Zellen an allen CD4+-Zellen zwischen Patienten mit einer Statin-Behandlung nach dem Hirninfarkt und Patienten ohne Statin-Behandlung ($p=0,022$) bzw. mit Patienten mit einer schon vor dem Hirninfarkt bestehenden Statin-Behandlung ($p=0,001$). Bei Patienten, die erst nach dem Hirninfarkt mit einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor behandelt wurden, war der Anteil der Treg signifikant größer (siehe Abbildung 7D). Weiter bestand ein signifikanter Unterschied bei der Anzahl der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen zwischen Patienten ohne Statin-Behandlung und Patienten mit einer Statin-Behandlung nach dem Hirninfarkt ($p=0,014$). Auch hier lag die Anzahl der Treg bei Patienten mit einer Statin-Behandlung nach dem Hirninfarkt höher (siehe Abbildung 7C). Die Zellzahlen und relativen Anteile der CD4+- und CD4+CD25hiFoxP3+CD127- -T-Zellen unterschieden sich nicht signifikant zwischen Patienten ohne und mit einer Statin-Behandlung (siehe Abbildung 7A+B und E+F). Die Patienten, die bereits vor dem Hirninfarkt mit einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor behandelt wurden, wiesen jedoch jeweils die höchsten Werte auf.

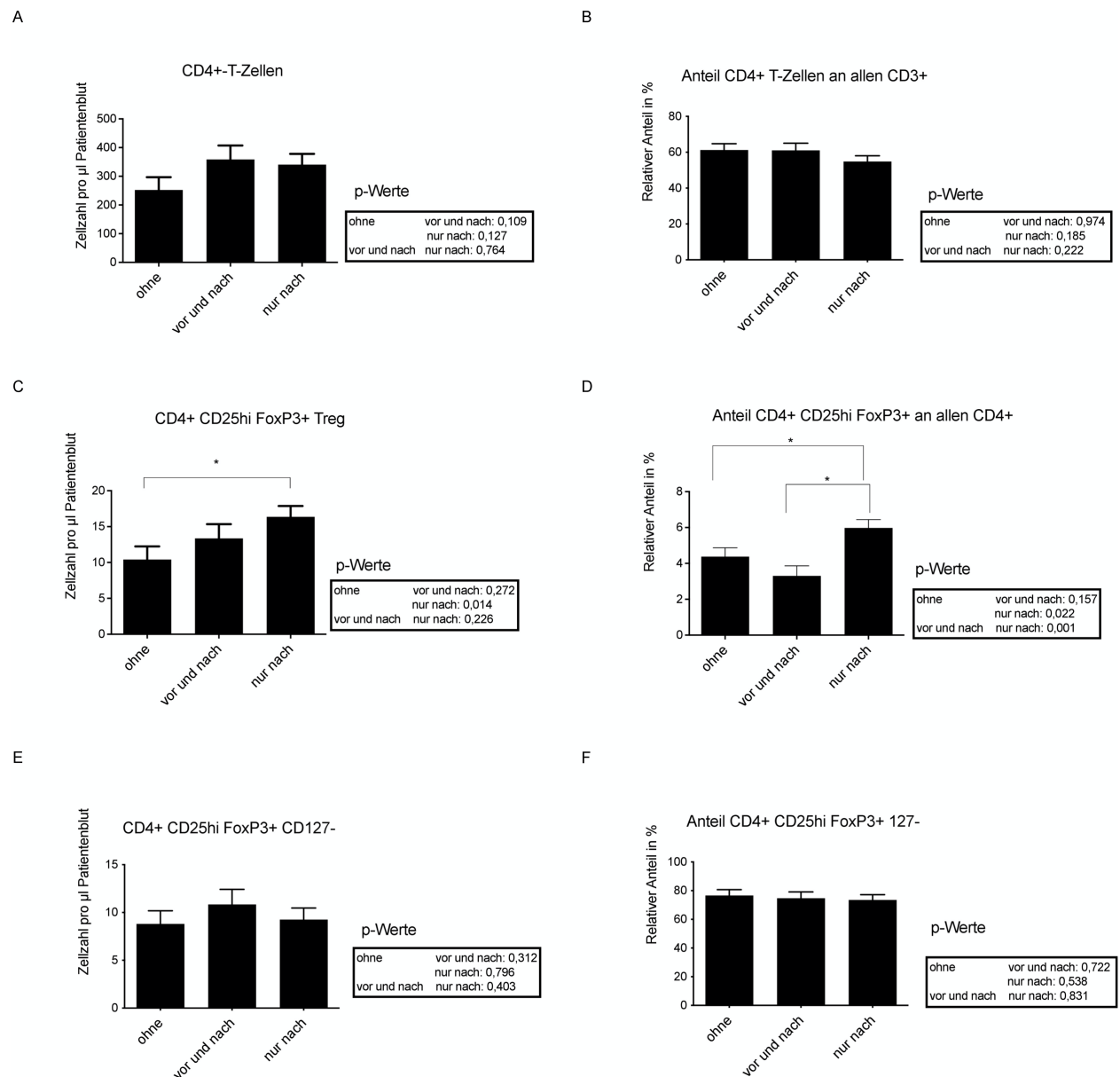


Abbildung 7: Vergleich der T-Zell-Subpopulationen bei Hirninfarkt-Patienten ohne Statin-Therapie (n=19) bzw. mit einer Statin-Therapie vor und nach (n=14) oder nur nach (n=21) dem Hirninfarkt. Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle.

A: Anzahl der CD4+-T-Zellen; B: relativer Anteil der CD4+-T-Zellen an allen CD3+-T-Zellen; C: Anzahl der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen; D: Relativer Anteil der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen; E: Anzahl der CD3+CD4+CD25hiFoxP3+CD127--T-Zellen; F: Relativer Anteil der CD4+CD25hiFoxP3+CD127-T-Zellen.

Abkürzungen: CD = *cluster of differentiation*; FoxP3 = *forkhead-box-protein*; * = $p < 0,05$ signifikanter Effekt

CD4+-T-Zellen und Treg bei Patienten mit und ohne Statin-Therapie (zeitlicher Verlauf)

Bei dem Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Lymphozyten-Subpopulationen mit (vor und nach bzw. nur nach dem Hirninfarkt) und ohne Statin-Therapie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 8A–F).

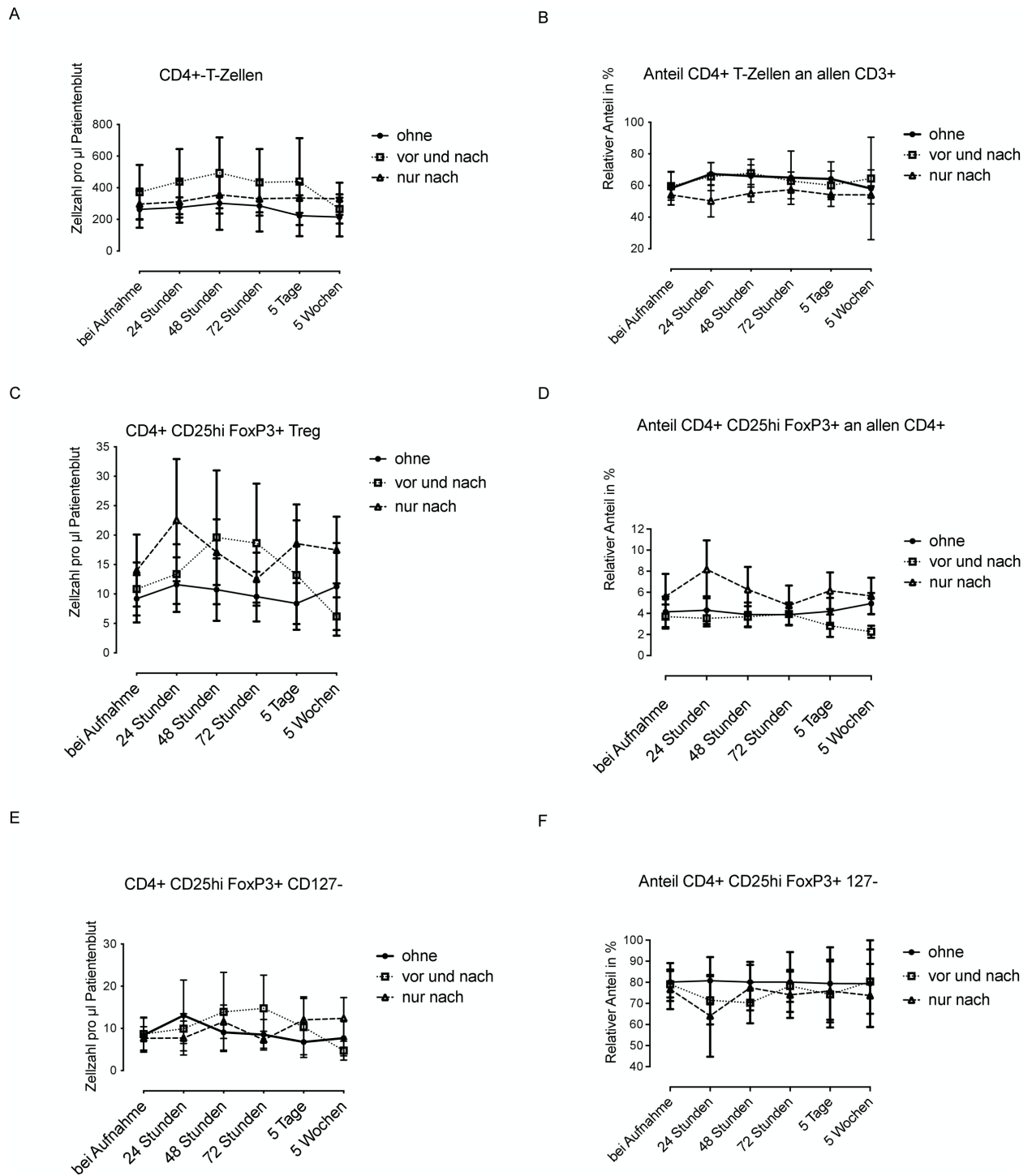


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der T-Zell-Subpopulationen bei Hirninfarkt-Patienten ohne Statin-Therapie (n=19) bzw. mit einer Statin-Therapie vor und nach (n=14) oder nur nach (n=21) dem Hirninfarkt. Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle.

A: Anzahl der CD4+-T-Zellen; B: relativer Anteil der CD4+-T-Zellen an allen CD3+-T-Zellen; C: Anzahl der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen; D: Relativer Anteil der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen; E: Anzahl der CD3+CD4+CD25hiFoxP3+CD127--T-Zellen; F: Relativer Anteil der CD4+CD25hiFoxP3+CD127-T-Zellen.

Abkürzungen: CD = *cluster of differentiation*; FoxP3 = *forkhead-box-protein*; * = $p < 0,05$ signifikanter Effekt

3.6 Vergleich der Lymphozytenzahlen bei Patienten mit unterschiedlicher Besserung des Gesundheitszustands

Zur Untersuchung des klinischen Ergebnisses wurden die mRS-Werte ermittelt und mittels logistischer Regression analysiert. Hierbei zeigte sich, dass ein niedriger mRS, also ein gutes klinisches Ergebnis (keine Symptome, keine wesentliche Funktionseinschränkung, geringgradige Funktionseinschränkung und mäßiggradige Funktionseinschränkung), signifikant mit einer höheren Anzahl von CD4+-T-Zellen (Odds-Ratio: 1.007; $p=0,03$) (s. Abbildung 9A) sowie mit einer höheren Anzahl von Treg korrelierte (Odds-Ratio: 1,16; $p=0,014$) (s. Abbildung 8C). Dies zeigte sich allerdings nur bei der Betrachtung der absoluten Zellzahlen pro μl Patientenblut. Bei Auswertung des prozentualen Anteils der Treg an den CD4 Zellen zeigten sich zwar ebenfalls ein höherer Anteil Treg an allen CD4+-T-Zellen bei den Patienten mit gutem klinischen Ergebnis. Der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant. (siehe Abbildung 9B).

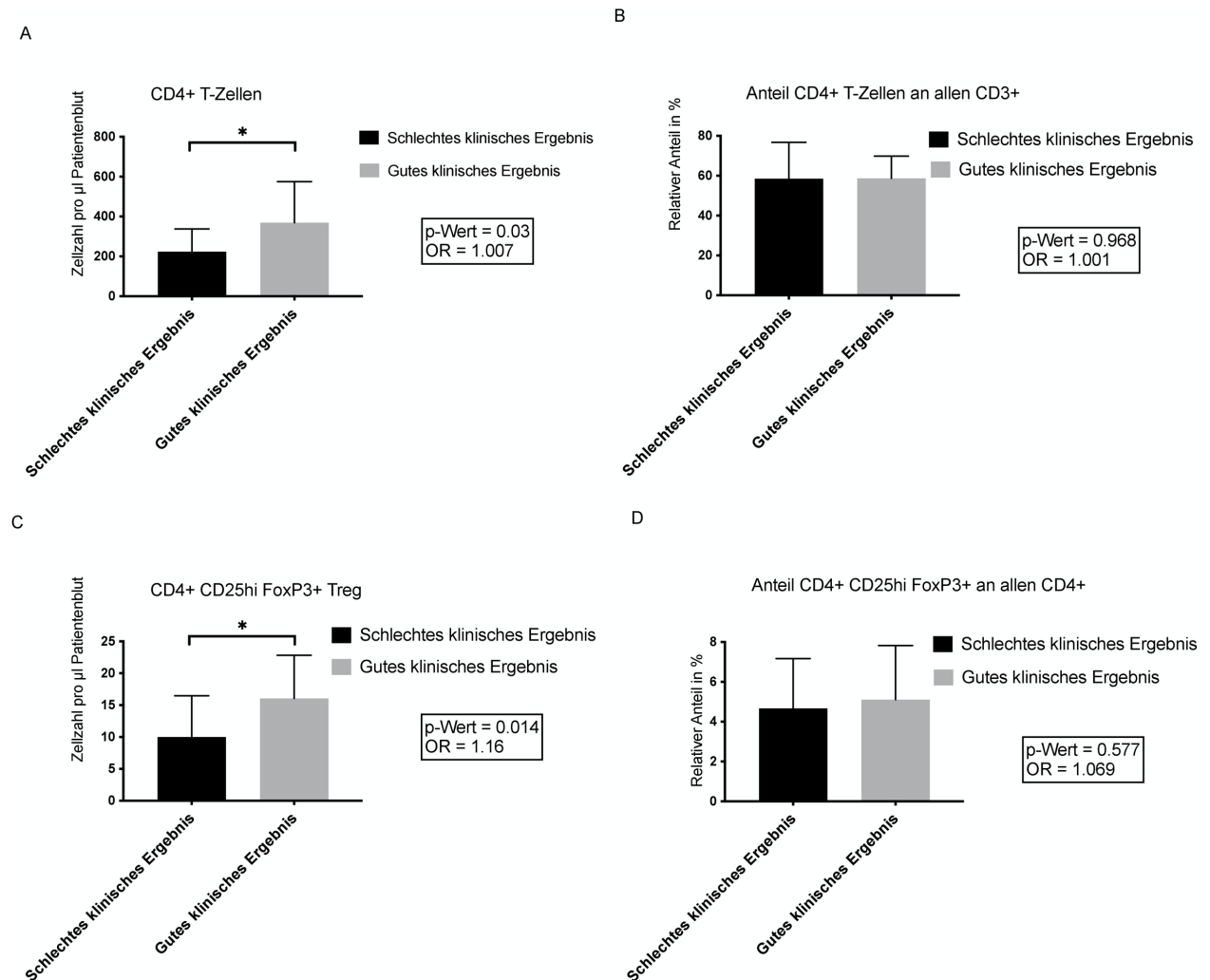


Abbildung 9: Vergleich der T-Zell-Subpopulationen bei Patienten mit gutem klinischen Ergebnis und schlechtem klinischen Ergebnis, gemessen mittels mRS. Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle.

A: Anzahl der CD4+-T-Zellen; B: relativer Anteil der CD4+-T-Zellen an allen CD3+-T-Zellen; C: Anzahl der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen; D: Relativer Anteil der CD4+CD25hiFoxP3+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen;

Gutes klinisches Ergebnis = Werte 0, 1, 2 oder 3 auf der modifizierten Rankin-Skala.

Schlechtes klinisches Ergebnis = Werte 4, 5 oder 6 auf der modifizierten Rankin-Skala.

Abkürzungen: CD = *cluster of differentiation*; FoxP3 = *forkhead-box-protein*;

4 Diskussion

Das Immunsystem spielt für die bei einem ischämischen Hirninfarkt ablaufenden pathophysiologischen Prozesse eine bedeutende Rolle und beeinflusst das klinische Ergebnis betroffener Patienten. Untersuchungen belegen, dass sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beim ischämischen Hirninfarkt eine bedeutende Funktion besitzen. Die neuroprotektive Rolle der Treg nach einem Hirninfarkt wurde bisher nur für kleine ischämische Areale belegt (52, 83, 102). Im Tiermodell wurde eine relevante systemische Immunsuppression beschrieben mit Apoptose von Lymphozyten und folgender Lymphopenie in sekundären Lymphorganen und dem peripheren Blut (17, 18).

In der vorliegenden Untersuchung kam es im Gesamtkollektiv innerhalb einer Woche nach dem Hirninfarkt und 4–6 Wochen später zu keinen signifikanten Veränderungen der Treg. Im peripheren Blut von Hirninfarkt-Patienten mit Infekt waren signifikant weniger CD3+CD4+-T-Zellen und CD4+CD25hiFoxP3+-Treg nachweisbar als bei Patienten ohne Infekt. Patientinnen und Patienten mit guter Besserung des Gesundheitszustands hatten durchweg höhere Absolutwerte der beiden T-Zell-Populationen.

4.1 CD4+-T-Lymphozyten bei Hirninfarktpatienten

In den vergangenen Jahren konnte wiederholt gezeigt werden, dass es im Rahmen des Leukozyten-Einstromes in das ZNS auch zu einer Akkumulation von T-Lymphozyten nur wenige Stunden nach einer Reperfusion kommt (103, 104).

Eine Depletion von T-Zellen führte im Tierexperiment zu einer reduzierten Infarktgröße (105, 106). Auch eine Suppression des T-Zell-Einstroms in das Gehirn verbesserte den Gesundheitszustand in einem experimentellen Hirninfarkt-Modell (107, 108). Lewis-Ratten, die mit einer Zytokin-Ausschüttung (Dominanz der IFN- γ -Sekretion) entsprechend einer Reaktion vom T-Helferzell-Typ-1 reagierten, zeigten ein funktional eingeschränktes Outcome (109).

Im Tiermodell führte sowohl eine permanente MCAO über 24 h als auch eine photochemisch induzierte Ischämie zur Infiltration von CD4+-T-Zellen ab dem ersten Tag. Die Anzahl der T-Zellen im ZNS stieg an Tag 3 weiter an und erreichte ein Maximum an Tag 7, um über die darauffolgenden sieben Tage wieder abzufallen (104, 110). Laut FACS-Analysen wies die ischämische im Vergleich zur nicht-ischämischen Hemisphäre nach einer permanenten MCAO über 24 h doppelt viele T-Lymphozyten auf (111). Eine

erhöhte Anzahl an CD4+-Zellen in der ischämischen Hemisphäre trat an Tag 14 und 30 im Vergleich zur kontralateralen Seite und zu scheinoperierten Mäusen. Mittels Immunhistochemie waren die CD4+-T-Zellen in der Periinfarktzone und im Infarktareal nachweisbar (112). In einer Studie zeigten Hirninfarkt-Patienten (n=46) bei der Aufnahme im Vergleich zu Kontrollen (n=14, gesunde Probanden oder Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen) signifikante niedrigere CD4+-T-Zellzahlen im Blut (79).

In der vorliegenden Arbeit wurde das periphere Blut der Patienten untersucht. Im zeitlichen Verlauf kam es im Gesamtkollektiv zu keinen signifikanten Veränderungen der CD4+-T-Zellzahlen. Möglicherweise wurde der von Stubbe et al. (112) beschriebene späte Anstieg der CD4+-T-Zellen an Tag 14 und 30 nicht erfasst. In der vorliegenden Studie zeigten jedoch Hirninfarkt-Patienten mit Infekt signifikant niedrigere CD4+-T-Zellzahlen im Vergleich zu Hirninfarkt-Patienten ohne Infekt. Dieses Ergebnis unterstützt das vielfach beschriebene Konzept einer Hirninfarkt-induzierten Immunsuppression (12, 113) und deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie, in der gezeigt wurde, dass Hirninfarktpatienten mit Infekt einen größeren Abfall aller Lymphozyten, aber auch der T-Helferzellen aufweisen (77). Es gab bereits mehrere Ansätze durch das Vermindern des T-Zell-Einstroms in das ZNS und der folgenden pro-inflammatorischen Reaktion das Infarktvolume zu reduzieren und das Outcome zu verbessern. Hier wurde z. B. der monoklonale Antikörper Natalizumab getestet, der an das Adhäsionsmolekül Integrin $\alpha\beta 1$ auf Leukozyten bindet und dadurch die Leukozytenadhäsion an das Endothel und damit die Infiltration ins Gehirn verhindert. Im Tiermodell mit permanenter MCAO konnte dadurch Infarktvolume reduziert und Outcome gebessert werden (105). Klinische Studien zeigten keinen eindeutigen Erfolg (114). Eine weitere Substanz, die auch in klinischen Studien erfolgsversprechend scheint, ist Fingolimod. Fingolimod induziert eine Lymphopenie, wodurch die Einwanderung ins ZNS vermindert werden könnte. In einer klinischen Phase II Studie zeigten sich kleinere Infarktareale und eine besserer Gesundheitszustand im Vergleich zu Kontrollen gemessen an NIHSS und mRS, was aber bisher nicht in größeren Studien bestätigt werden konnte (115-117). Es traten unter Fingolimod-Therapie auch kardiovaskuläre Nebenwirkungen auf, wie z. B. Bradykardie und AV-Blockade (116, 118). Außerdem gibt es Hinweise, dass es teratogen wirken kann (116, 119).

Statine könnten ebenfalls einen positiven Effekt haben und eine mögliche Therapie darstellen, da sie, neben ihrer Lipidsenkenden Funktion, auch immunmodulatorische

Eigenschaften besitzen. In Patienten mit stabilem Verlauf nach Herztransplantation wurde gezeigt, dass ex vivo durch eine Inkubation der PBMC mit Atorvastatin die Anzahl der CD3+CD4+ Zellen reduziert wurde (120). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein Unterschied der Anzahl von CD4+-T-Zellen im Blut bei Hirninfarkt-Patienten mit oder ohne Statin-Therapie. Diese Ergebnisse decken sich mit der ASSORT Studie von 2017, in der sich kein Vorteil einer Statin-Therapie zeigte, gemessen an dem neurologischen Outcome nach 90 Tagen (121).

4.2 Infektionen bei Hirninfarktpatienten

Die Häufigkeit und Art von Komplikationen nach einem Hirninfarkt wurden vielfach untersucht. Die Inzidenz von Infektionen variiert je nach Studie und Zeitpunkt der Untersuchung im Krankheitsverlauf und liegt zwischen 17 und 59 % (17 % Chamorro et al. (74), 30 % Urra et al. (77), 59 % Castillo et al. (122)).

In der vorliegenden Studie zeigten Patienten in 35,6 % der Fälle einen Infekt. Wie auch in der Literatur beschrieben, traten am häufigsten Pneumonien (76,2 % aller Infektionen und 27,1 % aller Hirninfarkt-Patienten) gefolgt von Harnwegsinfektionen (14,3 % aller Infektionen und 5,1 % aller Hirninfarkt-Patienten) auf.

Wie in Kapitel 1.2 dargelegt treffen auf Hirninfarkt-Patienten eine Reihe von für einen Infekt prädisponierende Faktoren zu (z. B. Dysphagie, Immobilität). Die vorliegenden Daten unterstützen jedoch auch das Konzept der *Poststroke*-Immunsuppression. Die durch die zerebrale Ischämie ausgelöste Lymphozytopenie könnte Ausdruck einer systemischen Immunsuppression sein, die das Auftreten von Infektionen erleichtert. Alternativ kann auch eine vorbestehende (CD4+ T-) Lymphopenie ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines Infekts nach akutem ischämischem Hirninfarkt darstellen. Möglicherweise lässt sich der Abfall der CD4+-T-Lymphozyten in der Klinik als Marker für die Entwicklung einer Infektion nutzen.

4.3 Verlauf von Treg bei Patienten mit ischämischem Hirninfarkt

Ein bedeutender Akteur für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems sind die Treg. Verschiedene Untersuchungen belegen eine signifikant erhöhte Anzahl von Treg im peripheren Blut von Patienten an Tag 1, 7 und 21 nach dem Hirninfarkt im Vergleich zu Kontrollpatienten (123, 124). FACS-Analysen zeigen eine Invasion von Treg im Tiermodell ab dem dritten Tag nach einer MCAO. Fünf Tage nach der MCAO sind die

Zellen immunhistochemisch im Bereich der Penumbra (Periinfarktzone) nachweisbar. Treg-depletierte Mäuse zeigen im Verlauf ein signifikant größeres Hirninfarkt-Volumen und eine schlechtere neurologische Funktionalität. Weiter ist der Einstrom der Neutrophilen 24 h nach der MCAO bei Treg-depletierten Mäusen signifikant größer als in der Kontrollgruppe (dieser Effekt ist 5 Tage nach MCAO noch sichtbar, aber nicht mehr signifikant). Der Einstrom von CD3⁺-Zellen unterscheidet sich nicht in den beiden Gruppen (83). Bei der Analyse der Verteilung der Treg im ZNS und im peripheren Lymphgewebe nach MCAO zeigt sich eine signifikant erhöhte Treg-Anzahl ipsilateral im ZNS an Tag 14 und 30 im Vergleich zu Tag 7 und im Vergleich zum peripheren Lymphgewebe. Die Treg sind in der Periinfarktzone und im Infarktareal lokalisiert. Auch ist eine vermehrte Treg-Proliferation im ZNS im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen nachweisbar (112). Im peripheren Blut zeigen die Treg-depletierten Tiere signifikant höhere Spiegel an IFN- γ und TNF- α . Durch die Gabe von Antikörpern gegen TNF- α und IFN- γ kann die sekundäre Größenzunahme des Infarktareals in diesen Mäusen verhindert werden. Eine intrazerebroventrikuläre Injektion von IL-10 in Treg-depletierte Mäuse reduziert die Infarktgröße nach 7 Tagen signifikant und hemmt die postischämische Steigerung der TNF- α - und IL-1 β -Expression. Bei einem Cotransfer von Treg aus IL-10-defizienten Mäusen bleiben die Infarktareale vergleichbar groß zu denen der Treg-depletierten Tieren, was auf einen zerebroprotektiven Effekt des von Treg sezernierten IL-10 hindeutend (125).

In der vorliegenden Studie traten keine signifikanten Veränderungen im zeitlichen Verlauf der Treg im peripheren Blut der Hirninfarktpatienten zu den untersuchten Zeitpunkten auf. Ein Vergleich zu einer Kontrollgruppe fand nicht statt, da der Schwerpunkt der Untersuchung auf der Zeitkinetik lag. In anderen Studien lag die Anzahl an Treg bei Patienten mit Hirninfarkt (n=71) an Tag 1, 7 und 21 höher als bei Kontrollpatienten (123). Laut Tiermodellen sind Treg wenige Tage nach dem Hirninfarkt in der ipsilateralen Hemisphäre nachweisbar (83). Die Anzahl der FoxP3⁺-Treg ist in der ischämischen Hemisphäre an Tag 7, 14 und 30 im Vergleich zur kontralateralen Seite und zum ZNS scheinoperierter Tiere erhöht. Außerdem steigt die Treg-Anzahl an Tag 14 und 30 im Vergleich zu Tag 7 signifikant an. CD4⁺-Treg sind im Infarktareal und in der Periinfarktzone nachweisbar. Die Treg-Anzahl ist auch in zervikalen und inguinalen Lymphknoten sowie in der Milz erhöht. Die starke Proliferation der Treg an Tag 7 und 14 (Nachweis mit dem Proliferationsmarker Ki-67) fällt an Tag 30 wieder ab (112). Eine

mögliche Proliferationssteigerung der Treg im Zeitraum von ein bis zwei Wochen nach dem Infarkt wurde in der vorliegenden Studie nicht erfasst, da die Zellen nur innerhalb der ersten fünf Tage und nach 4–6 Wochen bestimmt wurden.

4.4 Treg und Infektionen bei Hirninfarktpatienten

In der vorliegenden Studie waren die Treg-Zahlen bei den Patienten mit einem Infekt nach einem Hirninfarkt zu den Messzeitpunkten nicht signifikant verschieden. Lediglich bei Patienten ohne Infekt war ein signifikanter Anstieg der Treg innerhalb der ersten 24 h nach Aufnahme und ein signifikanter Abfall 72 h nach Aufnahme nachweisbar. Bei den Patienten mit Infekt war der erkennbare Abfall der Treg innerhalb der ersten 48 h dagegen nicht signifikant. Diese Befunde stimmen mit Ergebnissen von Urra et al. überein, die zeigen, dass zwar T-Helferzellen bei Hirninfarkt-Patienten mit Infekt im Verlauf abfallen, aber nicht Treg im Vergleich zu den Patienten ohne Infekt (77). Insgesamt zeigten die Patienten mit Infekt in der vorliegenden Studie eine signifikant geringere Anzahl an CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺-T-Zellen im peripheren Blut als Patienten ohne Infekt. Bei der Interpretation sollte berücksichtigt werden, dass diese Befunde keine Aussage über die Anzahl der Treg im ZNS bzw. über das Verhältnis der peripheren und in das ZNS einwandernden Treg zulassen.

Weiter lässt sich anhand der vorliegenden Befunde nicht klären, ob die Abnahme der Treg die Folge oder die Ursache der Immunsuppression ist. Auch lässt sich nicht ableiten, ob die beschriebene Immunsuppression durch das offensichtliche Begünstigen von Infektionen ein schädlicher Effekt ist oder vielmehr ein protektiver Effekt. Denn durch den Untergang der Blut-Hirn-Schranke und die Gewebsschädigung erhält das Immunsystem Kontakt zu vormals unbekanntem ZNS-spezifischen Antigenen. Hierdurch könnte eine autoaggressive Reaktion mit einer pro-inflammatorischen Immunantwort entstehen oder auch eine autoregulatorische und anti-inflammatorische Immunantwort (113). Ein möglicher Auslöser dieser Immunsuppression nach Hirninfarkt könnte die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und des sympathischen Nervensystems sein. In einer Studie korrelierte die erhöhte Mortalität drei Monate nach dem Hirninfarkt mit erhöhten Katecholamin-Spiegeln im Blut (74). In einer tierexperimentellen Studie ließ sich mit dem Glukokortikoid-Rezeptor-Blocker RU486 der Abfall von Lymphozyten reduzieren. Dies führte jedoch nicht zu einer niedrigeren Infektionsrate. Wurde allerdings das sympathische Nervensystem mit dem Betablocker

Propranolol gehemmt, zeigte sich eine niedrigeren Infektionsrate und eine reduzierte Mortalität der Tiere an Tag 7 (17, 126). **Tabelle 12** zeigt die bisher nachgewiesenen Veränderungen immunologischer Parameter, die mit Infektionen nach einem Hirninfarkt assoziiert sind.

Tabelle 12: Veränderungen von Parametern des Immunsystems bei Patienten mit Infektionen nach Hirninfarkt (nach Vogelsang)

Parameter	Erhöht/erniedrigt	Autoren
Zelluläre Parameter		
Anzahl der T-Lymphozyten	↓	Prass et al. (17)
Anzahl der CD4+-T-Zellen	↓	Vogelgesang et al. (79), Klehmet et al. (127)
Regulatorische T-Zellen (Treg)	↑ im Vergleich zu Kontrollpatienten*	Yan et al. (123)
Zytokine		
Interleukin-(IL)-10	↑	Chamorro et al. (74), Klehmet et al. (127)
Interleukin-(IL)-6	↑	Chamorro et al. (73), Klehmet et al. (125)
Interferon-gamma (IFN- γ)	↓	Klehmet et al. (125)
Hormone		
Norepinephrin im Urin	↑	Klehmet et al. (125)
Normetanephrin im Blut	↑	Chamorro et al. (73)

*) gesunde Kontrollen und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen

4.5 Klinisches Ergebnis und Treg

Bisher gab es kontroverse Ergebnisse zu der Frage, inwiefern Tregs das Outcome beeinflussen. Stubbe et al. neutralisierten Treg in Mäusen mit einem anti-CD25 Antikörper an Tag 3 und 14 nach MCAO. Sie fanden keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf das neurologische Ergebnis (112). Liesz et al. zeigten hingegen, dass im Tiermodell das neurologische Ergebnis schlechter war bei Mäusen, die 24 Stunden und an Tag 3 nach MCAO einen anti-CD25 Antikörper erhalten hatten (83). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Es bestand eine Korrelation zwischen dem klinischen Ergebnis (gemessen anhand mRS-Wert) und der Anzahl der Treg. Patienten mit einem besseren klinischen Ergebnis zeigten eine höhere Anzahl an Tregs in ihrem Blut. Zhang et al. zeigte, dass eine in vivo Expansion von Treg in Mäusen durch die Gabe eines IL2/IL2-Antikörper-Komplexes zu einem gebesserten neurologischen Gesundheitszustand führte (128), was eine neuroprotektive Funktion der Treg in einer zerebralen Ischämie vermuten lässt. Die mit dem IL2/IL2-Antikörper-Komplex behandelten Mäuse zeigten ebenfalls ein geringeres Infarktvolumen. In der

Arbeit von Liesz et al. zeigten die Treg depletierten Mäuse an Tag 7 signifikant größeres Infarkt volumen. Im nächsten Schritt erhielten Rag2-*knock-out* Mäuse, welche keine reifen T-Lymphozyten hervorbringen können, entweder CD4⁺ CD25⁻ T-Lymphozyten oder Treg. Die Mäusen, denen Treg fehlten, zeigten deutlich größere Infarkt areale (83). Pang et al. zeigten, dass bei Patienten mit größerem Infarkt weniger Tregs im Blut nachweisbar waren (129). Leider erfolgte in dieser Untersuchung keine Korrelation mit dem klinischen Ergebnis, aber es wurde bereits mehrfach belegt, dass es eine positive Korrelation zwischen der Infarktgröße und der Besserung des Gesundheitszustands gibt (130, 131).

4.6 Treg und Statine

In der vorliegenden Arbeit zeigten Patienten mit einer neu begonnenen Statin-Therapie nach dem Hirninfarkt eine signifikant höhere Anzahl an Treg (CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺-T-Zellen) bzw. einen signifikant höheren Anteil an Treg an allen CD4⁺-Zellen im Vergleich zu Patienten ohne Statin-Therapie. Innerhalb der Statin-Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf.

Laut in vitro Experimenten exprimieren CD4⁺-T-Zellen nach Zugabe von Atorvastatin vermehrt FoxP3 (132). Im MCAO-Tiermodell zeigen Ratten mit zerebraler Ischämie nach sieben Tagen eine höhere Anzahl an FoxP3⁺-Zellen im peripheren Blut als scheinoperierte Tiere. Durch eine Atorvastatin-Behandlung verringert sich die FoxP3-Population wieder. Diese Effekte werden ausschließlich an Tag 7, nicht aber an Tag 3 und Tag 15 beobachtet (133).

In der vorliegenden Studie wurde das periphere Blut der Patienten täglich bis zum fünften Tag und danach erst wieder nach 4–6 Wochen analysiert. Ein möglicher Effekt an Tag 7 wurde somit nicht erfasst.

Weiter stieg in einer Untersuchung die CD4⁺CD25^{hi}-Zellzahl bei Patienten, die bei einer Hyperlipidämie Pravastatin und Simvastatin erhielten (132). Laut in vitro und ex vivo Untersuchungen erhöht Atorvastatin, nicht aber Mevastatin und Pravastatin, die Anzahl humaner CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-T-Zellen (132). In der vorliegenden Studie wurde nicht unterschieden, welches Statin verabreicht wurde.

In der vorliegenden Studie zeigten Patienten mit einer neu begonnenen Statin-Therapie mehr CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺-T-Zellen als Patienten mit einer bestehenden Statin-Therapie. Die Ursache für diesen Unterschied lässt sich anhand der vorliegenden Daten

nicht klären. Es fehlen Angaben zur Compliance der Patienten bei längerer Statin-Einnahme und eine engmaschige Kontrolle der Zellzahlen über den gesamten Therapieverlauf. Möglicherweise kommt es initial nach Beginn der Statin-Therapie zu einem Anstieg der Treg mit anschließender Normalisierung.

4.7 Limitationen

- Stichprobengröße und Patientenauswahl: Es wurden nur 59 Personen in die Studie eingeschlossen, die in einer bestimmten Notaufnahme eines Akutkrankenhauses aufgenommen wurden. Eine größere Stichprobe aus verschiedenen Kliniken (multizentrisches Design) könnte die Repräsentativität der Ergebnisse verbessern. Darüber hinaus könnte die Auswahl der Patienten in der Notaufnahme zu einer potenziellen Verzerrung führen und die Generalisierbarkeit der Ergebnisse einschränken.
- Beobachtungsdesign und fehlende Kontrollgruppe: Die Studie hatte ein exploratives, prospektives Design, das auf Beobachtungen basierte. Es wurde jedoch keine Kontrollgruppe verwendet, um die Ergebnisse mit einer Vergleichsgruppe zu vergleichen (z.B. anderes Krankheitsbild, das zur Aufnahme im Krankenhaus führt oder gesunde Kontrollpersonen). Das Fehlen einer Kontrollgruppe könnte alternative Erklärungen für die beobachteten Unterschiede zwischen den Gruppen einschränken (z.B. Hospitalisierungs-bezogene und die Kausalität der beobachteten Effekte).
- Zeitliche Erfassung der T-Zell-Populationen: Die T-Zell-Populationen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Hirninfarkt erfasst. Der zeitliche Verlauf der T-Zell-Populationen könnte jedoch variabel sein und möglicherweise nicht vollständig in den gewählten Erfassungszeitpunkten erfasst werden. Eine häufigere Erfassung der T-Zell-Daten könnte ein genaueres Bild über den zeitlichen Verlauf der Populationen liefern.
- Methodische Limitierungen: Treg weisen eine Reihe charakteristischer Oberflächenmoleküle auf. Die Tatsache, dass viele dieser Marker auch von aktivierten T-Effektorzellen exprimiert werden, erschwert die Differenzierung. Auch der ursprünglich als exklusiver Treg-Marker geltende Transkriptionsfaktor FoxP3 wird zeitweise von aktivierten T-Effektorzellen exprimiert (134). In der vorliegenden Arbeit wurden daher neben den CD4+CD25^{hi}FoxP3⁺-Zellen auch CD4+CD25^{hi}FoxP3⁺CD127⁺-Zellen untersucht. Die Ergebnisse der beiden Zellpopulationen unterschieden sich jedoch kaum. Möglicherweise spielt CD127 bei Zellsortierungsverfahren eine größere Rolle und hilft bei der Gewinnung einer reineren

Treg-Population. Zumindest konnte mit Hilfe von Suppressionsassays nachgewiesen werden, dass eine fehlende Expression des IL-7-Rezeptor-alpha (CD127) eine hoch suppressive Population an CD4+CD25+-Zellen kennzeichnet (35).

- Eine Möglichkeit zur Differenzierung zwischen Treg und anderen T-Zellen in zukünftigen Arbeiten wäre eine Analyse des Desoxyribonukleinsäure-(DNS)-Methylierungsmusters des FoxP3-Genlokus. Eine Demethylierung der FoxP3-Region tritt ausschließlich bei Treg-Zellen auf. Alle anderen Zelltypen im peripheren Blut einschließlich der aktivierten Effektor-T-Zellen sind dort vollständig methyliert (135).
- Korrelationsanalysen: Die begrenzte Zahl an erfassten Faktoren in den Korrelationsanalysen könnten möglicherweise andere wichtige Faktoren übersehen haben, die die klinischen Ergebnisse beeinflussen könnten.
- Fehlende Langzeitbeobachtung: Die Studie erfasste Daten bis zu 6 Wochen nach dem Hirninfarkt. Eine längere Nachbeobachtung der Patienten über einen größeren Zeitraum könnte Einblicke in den Langzeitverlauf der T-Zell-Populationen und deren Zusammenhang mit der Prognose liefern.

Zusammenfassend sind weitere Studien mit größeren Stichproben, Kontrollgruppen und längeren Nachbeobachtungszeiträumen erforderlich, um die Ergebnisse dieser Studie zu validieren und umfassendere Erkenntnisse über die Rolle von regulatorischen T-Zellen nach einem ischämischen Hirninfarkt zu gewinnen.

4.8 Schlussfolgerungen

Trotz umfassender Analysen an Hirninfarkt-Patienten und an Tiermodellen der zerebralen Ischämie ist die Bedeutung des Immunsystems für den Krankheitsverlauf noch nicht gänzlich verstanden. Die vorliegenden Daten unterstützen das Konzept der Hirninfarkt-induzierten Immunsuppression. Befunde aus der Literatur belegen, dass eine präventive antibiotische Therapie oder eine immunmodulatorische Therapie die Besserung des Gesundheitszustandes nicht bei allen Hirninfarkt-Patienten positiv beeinflussen kann (17, 22-24). Eine lokale Erhöhung der Treg-Population in dem vom Hirninfarkt betroffenen Hirnareal könnte therapeutisch wirksam sein. In diesem Kontext könnte eine Statin-Therapie für einzelne Subgruppen von Hirninfarkt-Patienten sinnvoll sein. Vor dem klinischen Einsatz dieses Medikaments muss in weiteren Studien geklärt werden, welche Patientengruppen von einer Statin-Therapie profitieren und zu welchem Zeitpunkt mit der Therapie begonnen werden sollte.

5 Referenzen

1. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, Barengo NC, Beaton AZ, Benjamin EJ, Benziger CP, Bonny A, Brauer M, Brodmann M, Cahill TJ, Carapetis J, Catapano AL, Chugh SS, Cooper LT, Coresh J, Criqui M, DeCleene N, Eagle KA, Emmons-Bell S, Feigin VL, Fernandez-Sola J, Fowkes G, Gakidou E, Grundy SM, He FJ, Howard G, Hu F, Inker L, Karthikeyan G, Kassebaum N, Koroshetz W, Lavie C, Lloyd-Jones D, Lu HS, Mirijello A, Temesgen AM, Mokdad A, Moran AE, Muntner P, Narula J, Neal B, Ntsekhe M, Moraes de Oliveira G, Otto C, Owolabi M, Pratt M, Rajagopalan S, Reitsma M, Ribeiro ALP, Rigotti N, Rodgers A, Sable C, Shakil S, Sliwa-Hahnle K, Stark B, Sundstrom J, Timpel P, Tleyjeh IM, Valgimigli M, Vos T, Whelton PK, Yacoub M, Zuhlke L, Murray C, Fuster V, Group G-N-JGBoCDW. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol.* 2020;76(25):2982-3021.
2. Bundes Gd. Diagnosedaten der Krankenhäuser Region: Deutschland, ICD10: I63 Hirninfarkt, Art der Standardisierung: Standardbevölkerung "Deutschland 2011" [Internet]. [updated 11.11.2022; cited 12.05.2023 12.05.2023]. Available from: https://www.gbe-bund.de/gbe/!pkg_olap_tables.prc_set_page?p_uid=gast&p_aid=77927479&p_sprache=D&p_help=2&p_indnr=550&p_ansnr=17584315&p_version=2&D.001=100001&D.946=12920&D.011=44302.
3. Bundes Gd. Sterbefälle, Sterbeziffern (ab 1998) Jahr: 2021, Region: Deutschland, Alter: Alle Altersgruppen, Geschlecht: Insgesamt, Nationalität: Alle Nationalitäten, Art der Standardisierung: Standardbevölkerung "Deutschland 2011" [updated 11.11.2022; cited 04.05.2023 04.05.2023]. Available from: https://www.gbe-bund.de/gbe/!pkg_olap_tables.prc_set_orientation?p_uid=gastd&p_aid=90978378&p_sprache=D&p_help=2&p_indnr=6&p_ansnr=30931594&p_version=12&D.000=3&D.001=3&D.002=3&D.003=3&D.004=3&D.946=2&D.011=3&D.100=1.
4. Bundesamt S. Todesursachen: Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen 2023 [updated 16.12.2022; cited 2023 12.05.2023]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>.
5. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundorfer B, Schoffski O, Krobot KJ. Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke.* 2006;37(5):1179-83.

6. Strilciuc S, Grad DA, Radu C, Chira D, Stan A, Ungureanu M, Gheorghe A, Muresanu FD. The economic burden of stroke: a systematic review of cost of illness studies. *J Med Life*. 2021;14(5):606-19.
7. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24(1):35-41.
8. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999;22(9):391-7.
9. Arumugam TV, Granger DN, Mattson MP. Stroke and T-cells. *Neuromolecular Med*. 2005;7(3):229-42.
10. Diener H-C, Hacke W, Forsting M. Schlaganfall. 1 ed: Thieme; 2004. 342 p.
11. Viitanen M, Winblad B, Asplund K. Autopsy-verified causes of death after stroke. *Acta Med Scand*. 1987;222(5):401-8.
12. Chamorro A, Urra X, Planas AM. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke*. 2007;38(3):1097-103.
13. Vernino S, Brown RD, Jr., Sejvar JJ, Sicks JD, Petty GW, O'Fallon WM. Cause-specific mortality after first cerebral infarction: a population-based study. *Stroke*. 2003;34(8):1828-32.
14. Vargas M, Horcajada JP, Obach V, Revilla M, Cervera A, Torres F, Planas AM, Mensa J, Chamorro A. Clinical consequences of infection in patients with acute stroke: is it prime time for further antibiotic trials? *Stroke*. 2006;37(2):461-5.
15. Katzan IL, Cebul RD, Husak SH, Dawson NV, Baker DW. The effect of pneumonia on mortality among patients hospitalized for acute stroke. *Neurology*. 2003;60(4):620-5.
16. Koennecke HC, Belz W, Berfelde D, Endres M, Fitzek S, Hamilton F, Kreitsch P, Mackert BM, Nabavi DG, Nolte CH, Pohls W, Schmehl I, Schmitz B, von Brevern M, Walter G, Heuschmann PU, Berlin Stroke Register I. Factors influencing in-hospital mortality and morbidity in patients treated on a stroke unit. *Neurology*. 2011;77(10):965-72.
17. Prass K, Meisel C, Hoflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med*. 2003;198(5):725-36.
18. Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, Vandenbark AA, Hurn PD. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol*. 2006;176(11):6523-31.

19. Hetze S, Engel O, Romer C, Mueller S, Dirnagl U, Meisel C, Meisel A. Superiority of preventive antibiotic treatment compared with standard treatment of poststroke pneumonia in experimental stroke: a bed to bench approach. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(6):846-54.
20. Harms H, Prass K, Meisel C, Klehmet J, Rogge W, Drenckhahn C, Gohler J, Bereswill S, Gobel U, Wernecke KD, Wolf T, Arnold G, Halle E, Volk HD, Dirnagl U, Meisel A. Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *PLoS One.* 2008;3(5):e2158.
21. van de Beek D, Wijdicks EF, Vermeij FH, de Haan RJ, Prins JM, Spanjaard L, Dippel DW, Nederkoorn PJ. Preventive antibiotics for infections in acute stroke: a systematic review and meta-analysis. *Arch Neurol.* 2009;66(9):1076-81.
22. Westendorp WF, Vermeij JD, Zock E, Hooijenga IJ, Kruijt ND, Bosboom HJ, Kwa VI, Weisfelt M, Remmers MJ, ten Houten R, Schreuder AH, Vermeer SE, van Dijk EJ, Dippel DW, Dijkgraaf MG, Spanjaard L, Vermeulen M, van der Poll T, Prins JM, Vermeij FH, Roos YB, Kleyweg RP, Kerkhoff H, Brouwer MC, Zwinderman AH, van de Beek D, Nederkoorn PJ, investigators P. The Preventive Antibiotics in Stroke Study (PASS): a pragmatic randomised open-label masked endpoint clinical trial. *Lancet.* 2015;385(9977):1519-26.
23. Kalra L, Irshad S, Hodsoll J, Simpson M, Gulliford M, Smithard D, Patel A, Rebollo-Mesa I, Investigators S-I. Prophylactic antibiotics after acute stroke for reducing pneumonia in patients with dysphagia (STROKE-INF): a prospective, cluster-randomised, open-label, masked endpoint, controlled clinical trial. *Lancet.* 2015;386(10006):1835-44.
24. Chamorro A, Horcajada JP, Obach V, Vargas M, Revilla M, Torres F, Cervera A, Planas AM, Mensa J. The Early Systemic Prophylaxis of Infection After Stroke study: a randomized clinical trial. *Stroke.* 2005;36(7):1495-500.
25. Murphy KP, Travers P, Walport M, Janeway C, Mowat A, Weaver C. Janeway's immunobiology. 8th ed. New York ; London: Garland Science; 2012. xix, 868 p. p.
26. Battaglia M, Gregori S, Bacchetta R, Roncarolo MG. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol.* 2006;18(2):120-7.
27. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
28. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol.* 2007;8(5):457-62.
29. Suri-Payer E, Fritzsching B. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol.* 2006;28(1):3-16.
30. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):337-42.

31. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-6.
32. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001;27(1):20-1.
33. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(1):129-38.
34. Santegoets SJ, Dijkgraaf EM, Battaglia A, Beckhove P, Britten CM, Gallimore A, Godkin A, Gouttefangeas C, de Gruijl TD, Koenen HJ, Scheffold A, Shevach EM, Staats J, Tasken K, Whiteside TL, Kroep JR, Welters MJ, van der Burg SH. Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(10):1271-86.
35. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* 2006;203(7):1701-11.
36. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* 2006;203(7):1693-700.
37. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001;27(1):68-73.
38. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775-87.
39. Xie L, Choudhury GR, Winters A, Yang SH, Jin K. Cerebral regulatory T cells restrain microglia/macrophage-mediated inflammatory responses via IL-10. *Eur J Immunol.* 2015;45(1):180-91.
40. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 2009;30(5):626-35.
41. Schmitt EG, Williams CB. Generation and function of induced regulatory T cells. *Front Immunol.* 2013;4:152.
42. Cottrez F, Groux H. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation.* 2004;77(1 Suppl):S12-5.
43. Roncarolo MG, Levings MK. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(6):676-83.

44. Song Y, Wang N, Chen L, Fang L. Tr1 Cells as a Key Regulator for Maintaining Immune Homeostasis in Transplantation. *Front Immunol.* 2021;12:671579.
45. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001;182:207-14.
46. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2014;27:1-7.
47. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998;188(2):287-96.
48. DiPaolo RJ, Glass DD, Bijwaard KE, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells prevent the development of organ-specific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector T cells. *J Immunol.* 2005;175(11):7135-42.
49. Martin B, Banz A, Bienvenu B, Cordier C, Dautigny N, Becourt C, Lucas B. Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo. *J Immunol.* 2004;172(6):3391-8.
50. Campbell DJ. Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis. *J Immunol.* 2015;195(6):2507-13.
51. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol.* 2008;9(3):239-44.
52. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med.* 2011;17(7):796-808.
53. Muhammad S, Barakat W, Stoyanov S, Murikinati S, Yang H, Tracey KJ, Bendszus M, Rossetti G, Nawroth PP, Bierhaus A, Schwaninger M. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *J Neurosci.* 2008;28(46):12023-31.
54. Chamorro A, Meisel A, Planas AM, Urra X, van de Beek D, Veltkamp R. The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol.* 2012;8(7):401-10.
55. Dong R, Huang R, Wang J, Liu H, Xu Z. Effects of Microglial Activation and Polarization on Brain Injury After Stroke. *Front Neurol.* 2021;12:620948.
56. Shyu KG, Chang H, Lin CC. Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute ischaemic stroke. *J Neurol.* 1997;244(2):90-3.
57. Yilmaz G, Granger DN. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. *Neuromolecular Med.* 2010;12(2):193-204.
58. O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 1997;20(6):252-8.
59. Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, Weih M, Iurato L, Meisel A, Dirnagl U. Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett.* 1998;254(2):117-20.

60. Iadecola C, Salkowski CA, Zhang F, Aber T, Nagayama M, Vogel SN, Ross ME. The transcription factor interferon regulatory factor 1 is expressed after cerebral ischemia and contributes to ischemic brain injury. *J Exp Med*. 1999;189(4):719-27.
61. Planas AM, Soriano MA, Berruezo M, Justicia C, Estrada A, Pitarch S, Ferrer I. Induction of Stat3, a signal transducer and transcription factor, in reactive microglia following transient focal cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci*. 1996;8(12):2612-8.
62. Fassbender K, Rossol S, Kammer T, Daffertshofer M, Wirth S, Dollman M, Hennerici M. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J Neurol Sci*. 1994;122(2):135-9.
63. Minami M, Satoh M. Chemokines and their receptors in the brain: pathophysiological roles in ischemic brain injury. *Life Sci*. 2003;74(2-3):321-7.
64. Okada T, Suzuki H, Travis ZD, Zhang JH. The Stroke-Induced Blood-Brain Barrier Disruption: Current Progress of Inspection Technique, Mechanism, and Therapeutic Target. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18(12):1187-212.
65. Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol*. 2009;31(4):497-511.
66. Lindsberg PJ, Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML. Mast cells as early responders in the regulation of acute blood-brain barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(4):689-702.
67. Konsman JP, Drukarch B, Van Dam AM. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci (Lond)*. 2007;112(1):1-25.
68. Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26(5):654-65.
69. Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke*. 2009;40(5):1849-57.
70. Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, Orthey E, Arumugam TV, Leypoldt F, Simova O, Thom V, Friese MA, Prinz I, Holscher C, Glatzel M, Korn T, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood*. 2012;120(18):3793-802.
71. Kostulas N, Pelidou SH, Kivisakk P, Kostulas V, Link H. Increased IL-1beta, IL-8, and IL-17 mRNA expression in blood mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study. *Stroke*. 1999;30(10):2174-9.

72. Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, del Zoppo GJ, Hallenbeck JM, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Tyrrell PJ. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol.* 2004;4:2.
73. Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke.* 2000;31(10):2325-9.
74. Chamorro A, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera A, Gomez-Choco M, Torres F, Planas AM. Catecholamines, infection, and death in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci.* 2007;252(1):29-35.
75. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(10):775-86.
76. Czlonkowska A, Cyrta B, Korlak J. Immunological observations on patients with acute cerebral vascular disease. *J Neurol Sci.* 1979;43(3):455-64.
77. Urra X, Cervera A, Villamor N, Planas AM, Chamorro A. Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke. *Neuroscience.* 2009;158(3):1174-83.
78. Haeusler KG, Schmidt WU, Fohring F, Meisel C, Helms T, Jungehulsing GJ, Nolte CH, Schmolke K, Wegner B, Meisel A, Dirnagl U, Villringer A, Volk HD. Cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke in humans. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25(1-2):50-8.
79. Vogelgesang A, Grunwald U, Langner S, Jack R, Broker BM, Kessler C, Dressel A. Analysis of lymphocyte subsets in patients with stroke and their influence on infection after stroke. *Stroke.* 2008;39(1):237-41.
80. Haeusler KG, Schmidt WU, Foehring F, Meisel C, Guenther C, Brunecker P, Kunze C, Helms T, Dirnagl U, Volk HD, Villringer A. Immune responses after acute ischemic stroke or myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2012;155(3):372-7.
81. Pelidou SH, Kostulas N, Matusevicius D, Kivisakk P, Kostulas V, Link H. High levels of IL-10 secreting cells are present in blood in cerebrovascular diseases. *Eur J Neurol.* 1999;6(4):437-42.
82. Vila N, Castillo J, Davalos A, Esteve A, Planas AM, Chamorro A. Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2003;34(3):671-5.
83. Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, Giese T, Veltkamp R. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med.* 2009;15(2):192-9.

84. Aktories K, Forth W, Henschler D, Rummel W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. 11., überarb. Aufl. ed. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2013. 1187 S. p.
85. Cholesterol Treatment Trialists C, Mihaylova B, Emberson J, Blackwell L, Keech A, Simes J, Barnes EH, Voysey M, Gray A, Collins R, Baigent C. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet*. 2012;380(9841):581-90.
86. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med*. 2001;7(6):687-92.
87. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(11):1712-9.
88. Neuhaus O, Stuve O, Zamvil SS, Hartung HP. Are statins a treatment option for multiple sclerosis? *Lancet Neurol*. 2004;3(6):369-71.
89. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*. 2000;6(12):1399-402.
90. Neuhaus O, Strasser-Fuchs S, Fazekas F, Kieseier BC, Niederwieser G, Hartung HP, Archelos JJ. Statins as immunomodulators: comparison with interferon-beta 1b in MS. *Neurology*. 2002;59(7):990-7.
91. Diomedea L, Albani D, Sottocorno M, Donati MB, Bianchi M, Fruscella P, Salmona M. In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(8):1327-32.
92. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM, Investigators P. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA*. 2001;286(1):64-70.
93. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM, Jr., Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study I. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med*. 2001;344(26):1959-65.
94. Aktas O, Waiczies S, Smorodchenko A, Dorr J, Seeger B, Prozorovski T, Sallach S, Endres M, Brocke S, Nitsch R, Zipp F. Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. *J Exp Med*. 2003;197(6):725-33.

95. Leuenberger T, Pfueller CF, Luessi F, Bendix I, Paterka M, Prozorovski T, Treue D, Luenstedt S, Herz J, Siffrin V, Infante-Duarte C, Zipp F, Waiczies S. Modulation of dendritic cell immunobiology via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase. *PLoS One*. 2014;9(7):e100871.
96. Howard ML, Vincent AH. Statin Effects on Exacerbation Rates, Mortality, and Inflammatory Markers in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Review of Prospective Studies. *Pharmacotherapy*. 2016.
97. Krysiak R, Kowalcze K, Okopien B. The effect of statin therapy on thyroid autoimmunity in patients with Hashimoto's thyroiditis: A pilot study. *Pharmacol Rep*. 2016;68(2):429-33.
98. Li H, Wang CC, Zhang M, Li XL, Zhang P, Yue LT, Miao S, Wang S, Liu Y, Li YB, Duan RS. Statin-modified dendritic cells regulate humoral immunity in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Mol Cell Neurosci*. 2015;68:284-92.
99. Li XL, Liu Y, Cao LL, Li H, Yue LT, Wang S, Zhang M, Li XH, Dou YC, Duan RS. Atorvastatin-modified dendritic cells in vitro ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by up-regulated Treg cells and shifted Th1/Th17 to Th2 cytokines. *Mol Cell Neurosci*. 2013;56:85-95.
100. Eller P, Eller K, Wolf AM, Reinstadler SJ, Tagwerker A, Patsch JR, Mayer G, Rosenkranz AR. Atorvastatin attenuates murine anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2010;77(5):428-35.
101. Zeiser R, Youssef S, Baker J, Kambham N, Steinman L, Negrin RS. Preemptive HMG-CoA reductase inhibition provides graft-versus-host disease protection by Th-2 polarization while sparing graft-versus-leukemia activity. *Blood*. 2007;110(13):4588-98.
102. Ren X, Akiyoshi K, Vandenbark AA, Hurn PD, Offner H. CD4+FoxP3+ regulatory T-cells in cerebral ischemic stroke. *Metab Brain Dis*. 2011;26(1):87-90.
103. Qiu YM, Zhang CL, Chen AQ, Wang HL, Zhou YF, Li YN, Hu B. Immune Cells in the BBB Disruption After Acute Ischemic Stroke: Targets for Immune Therapy? *Front Immunol*. 2021;12:678744.
104. Schroeter M, Jander S, Witte OW, Stoll G. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *J Neuroimmunol*. 1994;55(2):195-203.
105. Liesz A, Zhou W, Mracsko E, Karcher S, Bauer H, Schwarting S, Sun L, Bruder D, Stegemann S, Cerwenka A, Sommer C, Dalpke AH, Veltkamp R. Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain*. 2011;134(Pt 3):704-20.
106. Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation*. 2006;113(17):2105-12.

107. Czech B, Pfeilschifter W, Mazaheri-Omrani N, Strobel MA, Kahles T, Neumann-Haefelin T, Rami A, Huwiler A, Pfeilschifter J. The immunomodulatory sphingosine 1-phosphate analog FTY720 reduces lesion size and improves neurological outcome in a mouse model of cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;389(2):251-6.
108. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, Iwaki T, Okada Y, Iida M, Cua DJ, Iwakura Y, Yoshimura A. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med.* 2009;15(8):946-50.
109. Becker KJ. Sensitization and tolerization to brain antigens in stroke. *Neuroscience.* 2009;158(3):1090-7.
110. Jander S, Kraemer M, Schroeter M, Witte OW, Stoll G. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15(1):42-51.
111. Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke.* 2002;33(2):586-92.
112. Stubbe T, Ebner F, Richter D, Engel O, Klehmet J, Rojl G, Meisel A, Nitsch R, Meisel C, Brandt C. Regulatory T cells accumulate and proliferate in the ischemic hemisphere for up to 30 days after MCAO. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(1):37-47.
113. Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS, Harms H, Meisel C, Ziemssen T, Prass K, Meisel A. Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke.* 2007;38(2 Suppl):770-3.
114. Elkind MSV, Veltkamp R, Montaner J, Johnston SC, Singhal AB, Becker K, Lansberg MG, Tang W, Kasliwal R, Elkins J. Natalizumab in acute ischemic stroke (ACTION II): A randomized, placebo-controlled trial. *Neurology.* 2020;95(8):e1091-e104.
115. Bai P, Zhu R, Wang P, Jiang F, Zhen J, Yao Y, Zhao C, Liang Z, Wang M, Liu B, Li M, Li N, Yuan J. The efficacy and safety of fingolimod plus standardized treatment versus standardized treatment alone for acute ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacol Res Perspect.* 2022;10(3):e00972.
116. Wang Z, Kawabori M, Houkin K. FTY720 (Fingolimod) Ameliorates Brain Injury through Multiple Mechanisms and is a Strong Candidate for Stroke Treatment. *Curr Med Chem.* 2020;27(18):2979-93.
117. Zhu Z, Fu Y, Tian D, Sun N, Han W, Chang G, Dong Y, Xu X, Liu Q, Huang D, Shi FD. Combination of the Immune Modulator Fingolimod With Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Pilot Trial. *Circulation.* 2015;132(12):1104-12.
118. Racca V, Di Rienzo M, Cavarretta R, Toccafondi A, Vaini E, Ferratini M, Rovaris M. Fingolimod effects on left ventricular function in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2016;22(2):201-11.

119. Karlsson G, Francis G, Koren G, Heining P, Zhang X, Cohen JA, Kappos L, Collins W. Pregnancy outcomes in the clinical development program of fingolimod in multiple sclerosis. *Neurology*. 2014;82(8):674-80.
120. Shaw SM, Najam O, Khan U, Yonan N, Williams SG, Fildes JE. Ezetimibe and atorvastatin both immunoregulate CD4+ T cells from cardiac transplant recipients invitro. *Transpl Immunol*. 2009;21(3):179-82.
121. Yoshimura S, Uchida K, Daimon T, Takashima R, Kimura K, Morimoto T, Investigator AT. Randomized Controlled Trial of Early Versus Delayed Statin Therapy in Patients With Acute Ischemic Stroke: ASSORT Trial (Administration of Statin on Acute Ischemic Stroke Patient). *Stroke*. 2017;48(11):3057-63.
122. Castillo J, Davalos A, Marrugat J, Noya M. Timing for fever-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1998;29(12):2455-60.
123. Yan J, Greer JM, Etherington K, Cadigan GP, Cavanagh H, Henderson RD, O'Sullivan JD, Pandian JD, Read SJ, McCombe PA. Immune activation in the peripheral blood of patients with acute ischemic stroke. *J Neuroimmunol*. 2009;206(1-2):112-7.
124. Yan J, Read SJ, Henderson RD, Hull R, O'Sullivan JD, McCombe PA, Greer JM. Frequency and function of regulatory T cells after ischaemic stroke in humans. *J Neuroimmunol*. 2012;243(1-2):89-94.
125. Liesz A, Bauer A, Hoheisel JD, Veltkamp R. Intracerebral interleukin-10 injection modulates post-ischemic neuroinflammation: an experimental microarray study. *Neurosci Lett*. 2014;579:18-23.
126. Prass K, Braun JS, Dirnagl U, Meisel C, Meisel A. Stroke propagates bacterial aspiration to pneumonia in a model of cerebral ischemia. *Stroke*. 2006;37(10):2607-12.
127. Klehmet J, Harms H, Richter M, Prass K, Volk HD, Dirnagl U, Meisel A, Meisel C. Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience*. 2009;158(3):1184-93.
128. Zhang H, Xia Y, Ye Q, Yu F, Zhu W, Li P, Wei Z, Yang Y, Shi Y, Thomson AW, Chen J, Hu X. In Vivo Expansion of Regulatory T Cells with IL-2/IL-2 Antibody Complex Protects against Transient Ischemic Stroke. *J Neurosci*. 2018;38(47):10168-79.
129. Pang X, Qian W. Changes in Regulatory T-Cell Levels in Acute Cerebral Ischemia. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*. 2017;78(4):374-9.
130. Khatri P, Conaway MR, Johnston KC, Acute Stroke Accurate Prediction Study I. Ninety-day outcome rates of a prospective cohort of consecutive patients with mild ischemic stroke. *Stroke*. 2012;43(2):560-2.
131. Meng X, Ji J. Infarct volume and outcome of cerebral ischaemia, a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Pract*. 2021;75(11):e14773.

132. Mausner-Fainberg K, Luboshits G, Mor A, Maysel-Auslender S, Rubinstein A, Keren G, George J. The effect of HMG-CoA reductase inhibitors on naturally occurring CD4+CD25+ T cells. *Atherosclerosis*. 2008;197(2):829-39.
133. Rodriguez-Perea AL, Gutierrez-Vargas J, Cardona-Gomez GP, Guarin CJ, Rojas M, Hernandez PA. Atorvastatin Modulates Regulatory T Cells and Attenuates Cerebral Damage in a Model of Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2017;12(1):152-62.
134. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(17):6659-64.
135. Wieczorek G, Asemissen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, Baron U, Stauch D, Kotsch K, Pratschke J, Hamann A, Loddenkemper C, Stein H, Volk HD, Hoffmuller U, Grutzkau A, Mustea A, Huehn J, Scheibenbogen C, Olek S. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res*. 2009;69(2):599-608.

6 Anhang

6.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sarah Elaine Lünstedt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Regulatorische T-Zellen bei Patienten nach ischämischen Hirninfarkt (engl.: *Regulatory T cells in patients with ischemic stroke*) 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) 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

6.2 Lebenslauf

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

6.3 Publikationsliste

- Juli 2014 Leuenberger et al., Modulation of dendritic cell immunobiology via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase, PLoS ONE 9(7): e100871. doi:10.1371/journal.pone.0100871
- September 2010 Siffrin et al., In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis, Immunity. 2010 Sep 24;33(3):424-36
- April 2007 Poster: Lünstedt et al., Modulating T cell response by HMG-CoA reductase inhibitors for neuroinflammation, gezeigt beim World Immune Regulation Meeting in Davos, Schweiz 2007

6.4 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater Professor Friedemann Paul bedanken, der mir durch kontinuierliche Anregungen, Hilfestellungen und nicht zuletzt durch die Überlassung des Themas die Fertigstellung dieser Doktorarbeit ermöglichte.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Volker Siffrin, der mir von Anfang an sehr professionell und verlässlich beratend, kritisch und hilfsbereit zur Seite stand. Ohne seine wiederholten Anregungen und Motivation wäre diese Arbeit sicher nicht fertig gestellt worden.

Danke an Sonia Waiczies für die Unterstützung bei dem Etablieren der Methoden im Labor. Magda Paterka, Tina Leuenberger, Thordis Hohnstein und Bibiane Seeger möchte ich danken für die Einarbeitung im Labor. Ich hatte durch sie das Glück nicht nur durch eine gute Schule zu gehen, sondern auch zu erfahren, wie wichtig es ist, Spaß bei der Arbeit zu haben. Sie haben immer ein offenes Ohr gehabt und sind mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Weiterhin danke ich herzlich Robert Günther, Natalie Asselborn und Christina Lill für ihre Unterstützung im Max Dellbrück Zentrum in Berlin-Buch. Ebenso gilt mein Dank dem Pflegepersonal der Rettungsstelle und der Stroke-Unit der Helios-Klinik Berlin-Buch. Da die Hirninfarkt-Patienten rund um die Uhr aufgenommen wurden, wurde ich von ihnen großartig unterstützt zu Zeiten, in denen ich nicht vor Ort sein konnte.

Für die enorme Hilfsbereitschaft und Einführung in die Neurologie und insbesondere in das Krankheitsbild des Hirninfarkts möchte ich mich bei Pawel Kreitsch bedanken. Mit Hilfe seiner gelassenen Art, Effizienz und Arbeitseinsatz ist es mir gelungen 59 Patienten mit einer Fülle an klinischen Daten in diese Studie einzuschließen.

Anne Daubmann und Lisa Brandes danke ich dafür, dass sie mir bei der Auswertung der Daten und Durchführung der Statistik mit Rat und Tat zur Seite standen.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden, dafür, dass sie mich in all der Zeit unterstützt haben.