

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

DISSERTATION

Visualisierung des Zelltodes im Schlaganfallmodell der Maus

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Peyman Bahmani

aus Essen

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. A. Wunder
2. Prof. Dr. med. M. A. Schäfers
3. Prof. Dr. med. C. Bremer

Datum der Promotion: 19.11.2010

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Schlaganfall	6
1.2 Molekulare Bildgebung	7
1.3 Die Pathophysiologie nach ischämischen Schlaganfall	10
1.4 Nekrose und Apoptose beim Schlaganfall	12
1.5 Das Zielmolekül: Phosphatidylserine	13
1.6 Der Ligand: Annexin A5	13
1.7 Das Signal: Der nah-infrarot Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5	16
1.8 Das Detektionssystem: Nicht-invasive fluoreszenzoptische Bildgebung im nah-infrarot Bereich	17
1.9 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit	19
2. Methoden	21
2.1 Versuchsprotokolle	21
2.2 Ischämieinduktion	22
2.3 Synthese von fluoreszenzmarkiertem Annexin A5	23
2.4 Injektion der Proben	23
2.5 Aufbau des NIRF-Bildgebungssystems	24
2.6 Nicht-invasive Bildgebung	25
2.7 Auswertung und Statistik der nicht-invasiven Bilder	25
2.8 Ex-vivo Bildgebung	25
2.8.1 Gehirne und Gehirnschnitte	25
2.8.2 TTC-Färbung	26
2.9 Histologie	26
2.9.1 Annexin A5 und Propidiumiodid	26
2.9.2 TUNEL-Färbung	27
2.9.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
2.9.4 Auswertung Histologie	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Nicht-invasive Bildgebung der Maus und ex-vivo Bildgebung des Gehirns	29
3.2 Target-to-background-ratios	30
3.3 Ex-vivo Gehirnschnitte und TTC-Färbung	31
3.4 Histologie	32
3.5 Verteilung	35

4. Diskussion.....	37
4.1 Nicht-invasive NIRF-Bildgebung und Target-to-background-ratios.....	38
4.2 Ex-vivo NIRF-Bildgebung der entnommenen Gehirne und der Gehirnschnitte.....	39
4.3 Histologie.....	40
4.4 Klinische Perspektive	42
4.5 Ausblick	43
Zusammenfassung	44
Literaturverzeichnis	46
Abkürzungsverzeichnis	51
Danksagung	53
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Publikationen	55
Erklärung.....	56

1. Einleitung

1.1 Schlaganfall

Die zweithäufigste Todesursache weltweit nach der koronaren Herzkrankheit ist der Schlaganfall. In Europa beträgt die jährliche Inzidenz auf 100.000 Einwohner für Männer 141,3 und für Frauen 94,6. Der demographische Faktor des Alterns wird in den nächsten zwei Dekaden zu einem weiteren Anstieg der Inzidenz führen. Der Schlaganfall ist die Hauptursache für eine Langzeitbehinderung und Pflegebedürftigkeit im Alter und hat somit eine hohe sozioökonomische Bedeutung [Donnan et al., 2008; The European Registers of Stroke Investigators, 2009]. Die durch Schlaganfälle in Deutschland verursachten direkten und indirekten Kosten werden für den Zeitraum 2006 bis 2010 auf ca. 108 Milliarden Euro geschätzt [Kolominsky-Rabas et al., 2006]. Man unterscheidet ischämische und hämorrhagische Schlaganfälle. Beim ischämischen Schlaganfall, der einen Anteil von 80 % ausmacht, kommt es zu einem thrombotischen oder thromboembolischen Verschluss eines gehirnversorgenden Gefäßes. Die konsekutiv eintretende Reduktion des zerebralen Blutflusses im abhängigen Stromgebiet führt über direkte Schäden und komplexe Kaskaden zu einem Untergang von Gewebe [Donnan et al., 2008].

Die aktuell eingesetzten Therapiestrategien, welche in kontrollierten Studien einen Nutzen für Patienten mit ischämischen Schlaganfall haben sind folgende: Die "Stroke Unit" als Therapiekonzept, systemische oder lokale Thrombolyse mit "recombinant tissue plasminogen activator" (rt-PA) innerhalb von 4,5 Stunden nach Beginn des Schlaganfalls, Gabe von Acetylsalicylsäure (Aspirin®) innerhalb von 48 Stunden und die dekompressive Hemikraniektomie bei ausgedehnten Infarkten. Zurzeit kann bei nur ca. 6 % der Patienten eine Thrombolyse erfolgen. Ursache hierfür ist vor allem das Verstreichen des Zeitfensters von momentan 4,5 Stunden nach Schlaganfall bei Klinikaufnahme [California Acute Stroke Pilot Registry Investigators, 2005].

Die Inzidenzen, die sozioökonomischen Auswirkungen und die limitierten Therapiemöglichkeiten unterstreichen die Notwendigkeit einer intensiven Forschung im Bereich des ischämischen Schlaganfalls. Von Methoden, die eine nicht-invasive und spezifische Visualisierung des Zelltodes beim ischämischen Schlaganfall im Tiermodell und beim Patienten erlauben verspricht man sich einen wertvollen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung [Meairs et al., 2006].

1.2 Molekulare Bildgebung

Die molekulare Bildgebung ist eine wachsende biomedizinische Forschungsdisziplin mit dem Ziel biologische Prozesse auf molekularer bzw. zellulärer Ebene nicht-invasiv mit hoher Spezifität in lebenden Organismen darzustellen. Dies wird durch die Entwicklung spezifischer Marker, die mit hoher Affinität an Zielmoleküle (molekulare Targets) binden möglich. Diese Zielmoleküle spielen in einem biologischen Prozess eine wesentliche Rolle. Im Gegensatz dazu stehen konventionelle bildgebende Verfahren, die einen anatomisch-morphologischen Zustand beschreiben, wie beispielsweise strukturelle Magnetresonanztomographie (MRT) oder Computertomographie (CT) [Massoud und Gambhir, 2003]. Da bei pathologischen Prozessen molekulare Veränderungen im Krankheitsverlauf vor den morphologischen Veränderungen auftreten, soll mit Hilfe der molekularen Bildgebung eine frühere Diagnosestellung ermöglicht werden. Aufgrund der Spezifität der molekularen Bildgebung können Pathologien nicht nur früher, sondern auch präziser und verlässlicher detektiert werden. Zukünftig sollen mehrere Prozesse gleichzeitig dargestellt und quantifiziert werden können. Eine Kombination von morphologischen Informationen aus der konventionellen mit der molekularen Bildgebung sind möglich [Grimm und Wunder, 2005].

Neben Vorteilen für den klinischen Einsatz sind auch die Vorteile in der Forschung zu nennen. Sie bestehen vor allem in der Visualisierung einer Pathologie im Kontext eines gesamten Organismus. Dadurch wird es möglich z. B. nicht-invasiv im Tiermodell Therapiestratifizierungen durchzuführen [Kashefi et al., 2008].

Die Abbildung 1 demonstriert den Prozess für die Entwicklung eines geeigneten Markers, der für die molekulare Bildgebung genutzt werden kann.



Abb. 1: Notwendige Schritte bei der Entwicklung eines Markers für die molekulare Bildgebung einer Pathophysiologie.

Der Prozess beginnt mit der Charakterisierung eines spezifischen Zielmoleküls (molekulares Target), das an der Pathophysiologie des zu untersuchenden Prozesses

wesentlich beteiligt ist. Im folgenden Schritt muss ein spezifischer Ligand gefunden werden, welcher mit einer hohen Spezifität und Affinität an das Zielmolekül bindet. Dieser Ligand muss im nächsten Schritt für die Bildgebung markiert werden. Ein markierter Ligand wird auch als molekularer Marker bezeichnet.

Der molekulare Marker muss nach systemischer Applikation sein Zielmolekül erreichen können, das heißt biologische Barrieren wie Gefäßwände oder Membranen überwinden können [Weissleder und Mahmood, 2001]. Dazu unterliegt der molekulare Marker den Regeln der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik, wie z. B. Verteilung, Metabolismus, Exkretion oder auch unspezifische Bindungen. Auch die Eigenschaft des molekularen Markers, wie Löslichkeit, Ladung und Bindungseigenschaften entscheiden, mit welcher Verfügbarkeit der Marker an das Zielmolekül binden kann. Als Liganden stehen Proteine wie Antikörper, Zuckermoleküle oder auch Enzymsubstrate zur Verfügung [Grimm und Wunder, 2005].

Die molekularen Marker können in drei Gruppen unterteilt werden (Abbildung 2):

(A) Unspezifische Marker, welche nicht an Zielmoleküle binden und somit zur Darstellung von Permeabilität oder Perfusion von Gewebe eingesetzt werden können.

(B) Zielgerichtete Marker, welche an ein spezifisches Zielmolekül binden können. Unabhängig von der Interaktion mit der Zielstruktur senden diese Marker ein Signal.

(C) Aktivierbare Marker, welche ein Signal erst nach Interaktion mit dem Zielmolekül senden. Dabei können sie wie Abbildung 1 C zeigt entweder an dem Zielmolekül gebunden bleiben, oder sich in ihrer aktivierten Form davon lösen.

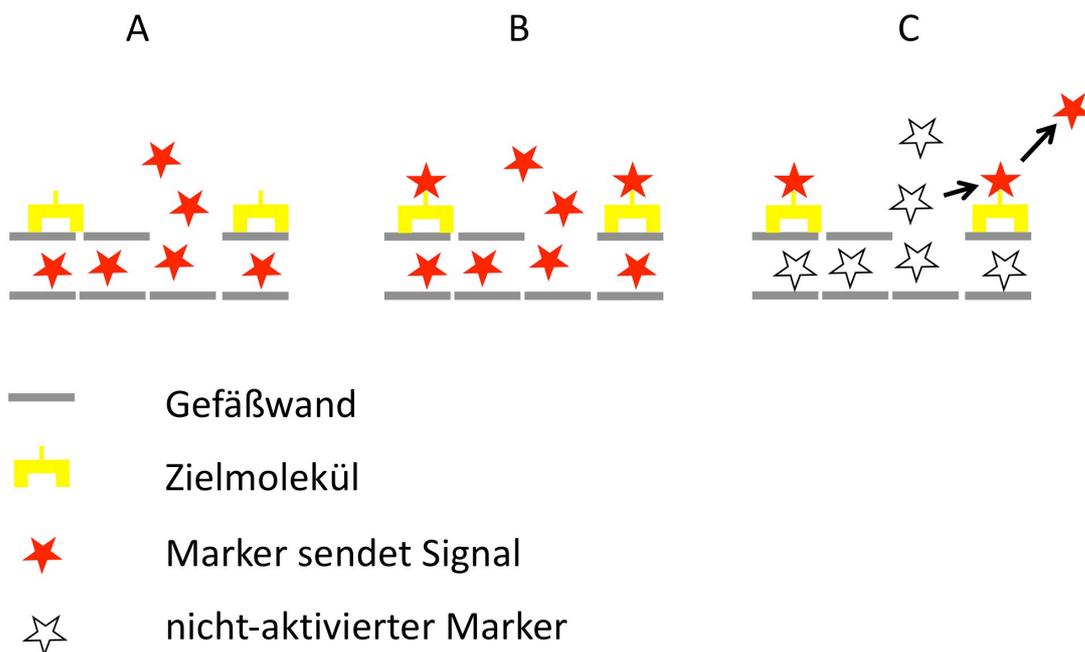


Abb. 2: Es werden die drei unterschiedlichen Gruppen von Markern gezeigt: Unspezifische Marker (A), zielgerichtete Marker (B), aktivierbare Marker (C) (in Anlehnung an [Weissleder, 2002]).

In der molekularen Bildgebung werden zielgerichtete und aktivierbare Marker eingesetzt. Die Markierungen der Liganden sind vielfältig. Sie können radioaktiv, mit Eisenoxydpartikel oder mit fluoreszierenden Molekülen markiert werden. Jeder Markierungsmöglichkeit steht ein Detektionssystem zur Verfügung: z. B. nuklearmedizinische Verfahren, die MRT, oder die optische Bildgebung [Massoud und Gambhir, 2003].

1.3 Die Pathophysiologie nach ischämischen Schlaganfall

Der thrombotische oder thromboembolische Verschluss eines zuführenden Gefäßes des Gehirns führt zu einer kritischen Reduktion der zerebralen Perfusion und somit zu einem ischämischen Schlaganfall. Neben einer direkten Schädigung von Gewebe werden komplexe Schadenskaskaden eingeleitet. Die Abbildung 3 zeigt den zeitlichen Ablauf wichtiger pathophysiologischer Prozesse und deren Beitrag zur Gewebeschädigung beim ischämischen Schlaganfall: Die Glutamat vermittelte Exzitoxizität, die Periinfarkt Depolarisation, die Inflammation und der programmierte Zelltod (Apoptose) [Dirnagl et al., 1999].

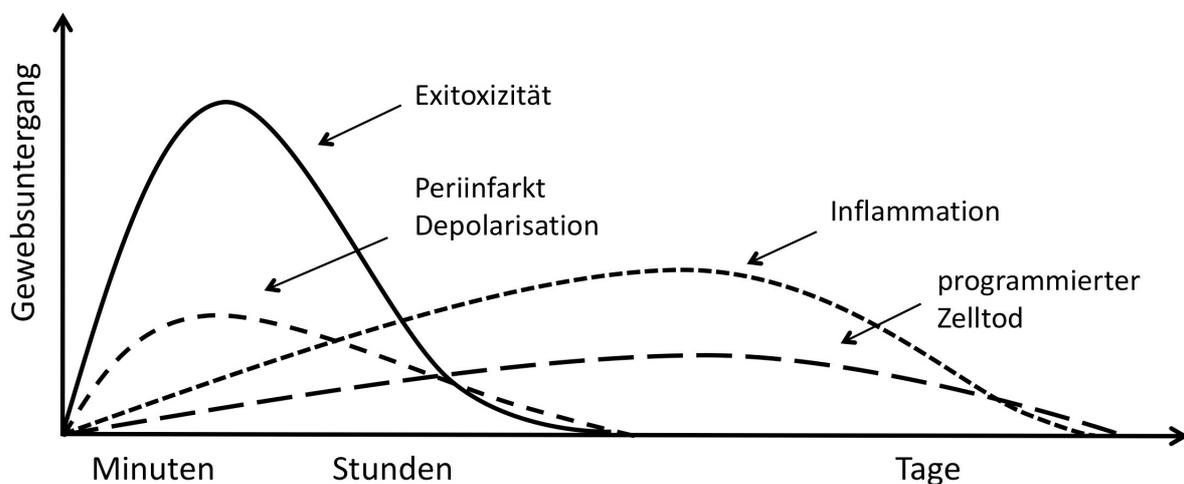


Abb. 3: Die Abbildung zeigt die Hauptschadensmechanismen beim Schlaganfall abhängig von der Zeit (x-Achse) und ihrem Anteil an der Gewebsschädigung (y-Achse) (Modifiziert nach [Dirnagl et al., 1999])

Beim ischämischen Schlaganfall unterscheidet man den Infarktkern und die Penumbra (siehe Abbildung 4). Der Infarktkern ist der Anteil des Schlaganfalls, welcher in der initialen Phase unwiederbringlich zerstört wird. Die Penumbra ist durch einen reversiblen Funktionsverlust gekennzeichnet, kann potentiell gerettet werden und wird daher auch als "tissue at risk" bezeichnet. Die Entwicklung der ischämischen Penumbra ist dynamisch. Ohne therapeutische Maßnahmen expandiert der Kern in die Penumbra hinein. Somit vergrößert sich das Ausmaß von zerstörtem Gewebe mit der Zeit. Durch eine frühzeitige thrombolytische Therapie kann die "tissue at risk" vor dem Gewebsuntergang bewahrt werden [Fisher, 2004; Phan et al., 2002].

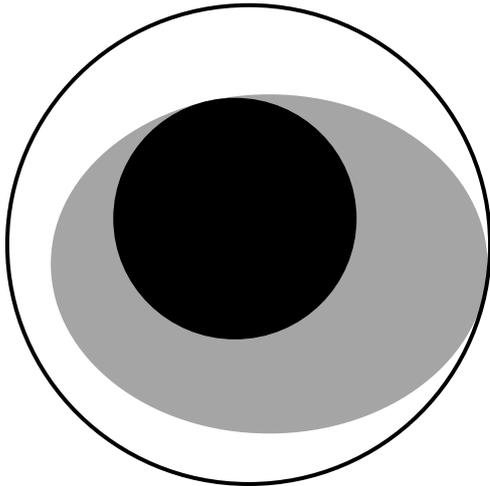


Abb. 4: Das Modell der ischämischen Penumbra ("tissue at risk"): schwarzer Kreis = Schlaganfallkern; grauer Kreis = ischämische Penumbra; weißer Kreis = Ödem ([Ebinger et al., 2009])

Das Zeitfenster für die Thrombolyse bei Schlaganfallpatienten liegt zurzeit bei 4,5 Stunden. Ausgeschlossen werden muss der hämorrhagische Schlaganfall sowie weitere Differentialdiagnosen. Aktueller Standard ist die Durchführung einer zerebralen CT vor Ablauf des Zeitfensters. Nach dem Zeitfenster von 4,5 Stunden kann der Patient nur bei vorhandener Penumbra von einer Thrombolyse profitieren. Um die Penumbra zu detektieren, eignet sich z. B. die Durchführung einer MRT mit diffusionsgewichteten (DWI, diffusion weighted imaging) und perfusionsgewichteten Sequenzen (PWI, perfusion weighted imaging) [Sobesky, 2009].

Die DWI zeigt das zytotoxische Ödem auf (Verminderung der Wasserdiffusion). Dieses Volumen korreliert mit dem Schlaganfallkern. Die PWI nutzt ein Kontrastmittel (z. B. gadoliniumhaltige Formulierungen), um die zerebrale Minderperfusion aufzuzeigen [Ebinger et al., 2009]. Gehirngewebe mit reduzierter Perfusion in den perfusionsgewichteten Aufnahmen, aber ohne Veränderung in den diffusionsgewichteten Aufnahmen ("PWI/DWI-mismatch") entspricht in etwa der ischämischen Penumbra [Paciaroni et al., 2009]. Dabei ist zu erwähnen, dass das Konzept des "PWI/DWI-mismatch" nicht einheitlich verwendet wird und sich Kritikpunkte beschreiben lassen. Beispielsweise zeigen Studien eine Reversibilität des Areals mit verminderter Diffusion (Schlaganfallkern) nach Reperfusion vor allem in der Frühphase der Ischämie auf. Andere Studien zeigen, dass die Hypoperfusion in der PWI und somit folglich die Penumbra teilweise überbewertet werden kann [Heiss und Sobesky, 2008].

Davis et al. fordern größere Phase III-Studien zur Validierung und Optimierung der MRT für eine genauere Charakterisierung der ischämischen Penumbra [Davis und Donnan, 2009]. Es bleibt festzuhalten, dass das Konzept des PWI/DWI-mismatch ein indirektes Verfahren zur Detektion von Schlaganfallkern und Penumbra darstellt, das bisher keine klare Abgrenzung der Areale erlaubt. Spezifische Schadensmarker, mit denen es möglich ist beim Schlaganfallpatienten direkt und hochspezifisch geschädigte Zellen zu detektieren, sind nicht verfügbar.

1.4 Nekrose und Apoptose beim Schlaganfall

Der Begriff Nekrose bezeichnet den Tod einer Zelle unter unkontrollierter Freisetzung von Zellbestandteilen. Die Nekrose ist morphologisch durch ein Aufschwellen der Zellen gekennzeichnet. Ein Integritätsverlust der Zellmembran führt zu einem Entweichen von zytoplasmatischen Bestandteilen, welche eine inflammatorische Antwort hervorrufen [Denecker et al., 2001]. Durch die Schädigung der Zellmembran werden Phosphatidylserine (PS) exponiert, welche bei intakten Zellen an der Innenseite der Zellmembran zu finden sind (s. u.) [Boehm et al., 2005].

Gegenstand aktueller Arbeiten zeigen auch geordnete Formen der Nekrose mit verschiedenen Aktivatoren auf [Vanden Berghe et al., 2007].

Bei der Apoptose treten keine zytoplasmatischen Bestandteile unkontrolliert aus der Zelle aus, wodurch eine inflammatorische Antwort ausbleibt. In der Frühphase der Apoptose werden PS aktiv durch Enzyme externalisiert, welches ein Phagozytosesignal für Makrophagen darstellt. Morphologisch ist Zellschrumpfung, eine Chromatinkondensation, ein Abschnüren von Zellmembrananteilen sowie eine nukleäre Fragmentierung zu verzeichnen. Apoptotische Zellen verlieren ihre Zellmembranintegrität, sobald ihr Vorrat an Adenosin-Triphosphat (ATP) aufgebraucht ist. Diese Zellen wechseln in einen Modus, welcher auch als sekundäre Nekrose bezeichnet wird. Die zentralen molekularen Vorgänge werden von der Proteasefamilie der Caspasen bestimmt [Denecker et al., 2001; Blankenberg, 2008].

Lange wurden nur die o. g. Arten des Zelltodes beim Schlaganfall beschrieben. In den letzten Jahren kamen weitere Wege des Zelltodes hinzu, wie z. B. die Parthantos oder die Autolyse. Zunehmend wird der Nekrose die Bezeichnung des programmierten

Zelltodes entgegengestellt, welcher die Apoptose als eine Variante beinhaltet [Harraz et al., 2008; Shaida A. Andrabi, 2008].

1.5 Das Zielmolekül: Phosphatidylserine

Phosphatidylserine sind bei intakten Zellen im Wesentlichen an der Innenseite der Zellmembran zu finden. Dies wird durch das ATP abhängige Enzym Translokase sowie Floppase gewährleistet. 1992 zeigten Fadok et al. anhand von Lymphozyten, dass bei der Apoptose ein Wechsel der Position der PS zur äußeren Seite der Zellmembran stattfindet. Dies dient als Phagozytosesignal für aktivierte Makrophagen [Fadok et al., 1992]. Die schnelle Translokation der PS nach Außen wird zusätzlich durch das Enzym Scramblase katalysiert [Zwaal et al., 2005]. Zusätzlich werden bei apoptotischen Zellen, welche ihre Zellmembranintegrität im Rahmen der sekundären Nekrose verlieren PS an der Innenseite zugänglich. Das Gleiche gilt für die Nekrose. Hier wird auch aufgrund der Zerstörung der Zellmembranintegrität der Zugang zu PS ermöglicht. Somit sind PS als Zielmoleküle für die Erfassung von Zelltod beim ischämischen Schlaganfall geeignet.

1.6 Der Ligand: Annexin A5

Annexin A5 (Ax5) ist ein 36 Kilodalton großes, körpereigenes Protein, das mit hoher Affinität an PS bindet. Es wurde 1970 erstmals aus der humanen Plazenta isoliert. Bisher geht man von einer Beteiligung an anti-koagulatorischen Prozessen aus [Boersma et al., 2005].

Ax5 wurde erfolgreich in tierexperimentellen, wie auch humanen Studien, als Ligand zur Visualisierung des Zelltodes mit nicht-invasiven bildgebenden Verfahren eingesetzt. Bei onkologischen Patienten wurde erfolgreich ein Therapiemonitoring beschrieben. Haas et al. zeigten an Patienten mit follikulären Lymphomen eine Ax5-Aufnahme nach Bestrahlungstherapie [Haas et al., 2004]. Thimister et al. konnten an Patienten mit akuten myokardialen Infarkten eine Ax5 Aufnahme im Infarktreal beschreiben und somit eine nicht-invasive Bildgebung von Zellschäden im Myokard demonstrieren [Thimister et al., 2003]. Kietselaer et al. benutzte Ax5, um vulnerable atherosklerotische Plaques der Herzkranzgefäße aufzuzeigen [Kietselaer et al., 2004]. Auch bei Schlaganfallpatienten wurde Ax5 bereits eingesetzt [Blankenberg et al., 2006]. Bei den oben genannten Arbeiten wurde Ax5 radioaktiv markiert und als Detektionssystem die

Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) verwendet.

Bei keiner dieser Arbeiten wurde eine Kontrollsubstanz eingesetzt. Somit konnte eine unspezifische Anreicherung von Ax5 im Zielgewebe wie beispielsweise aufgrund einer gestörten Blut-Gewebe-Schranke nicht ausgeschlossen werden. Um die Spezifität von Ax5 zur Visualisierung von geschädigten Zellen im Schlaganfallmodell der Maus zu untersuchen, wurde daher in dieser Arbeit eine Kontrollsubstanz eingesetzt. Dazu eignet sich eine inaktivierte Form von Ax5, die keine Affinität zu PS, aber ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften aufweist. Dies wird durch Kopplung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe an Ax5 erreicht. Nur bei Kopplung von einem Farbstoffmolekül pro Ax5-Molekül bleibt die Affinität von Ax5 für PS erhalten [Schellenberger et al., 2004].

Eine weitere wichtige Kontrolle der Spezifität von Ax5 für geschädigte bzw. tote Zellen sind ex-vivo und histologische Untersuchungen der Verteilung. Dazu ist es möglich ex-vivo Gehirnschnitte der entnommenen Gehirne der Versuchstiere mit Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) zu behandeln. TTC ist ein unspezifischer Protonenakzeptor mitochondrialer Enzymsysteme. Durch enzymatische Reduktion wird das TTC im intakten Gehirngewebe zu rotem Formazan umgewandelt. Die Umwandlung im toten Gewebe (Schlaganfallgebiet) bleibt aus. Dadurch lässt sich mit der TTC-Färbung durch den Schlaganfall stoffwechsellinaktives totes Gewebe (bleibt ungefärbt) von gesundem Gewebe (Rotfärbung) abgrenzen [Bederson et al., 1986] und dies mit der Verteilung von Ax5 ex-vivo vergleichen.

Eine weitere Kontrolle ist die histologische Prüfung der Verteilung von Ax5 im Vergleich zu bekannten Zelltodmarkern. Dafür eignet sich das rot fluoreszierende Propidiumiodid (PI). PI kann eine intakte Zellmembran nicht überwinden. Ist die Zellmembran jedoch geschädigt, kann der Farbstoff in die Zelle eindringen und interkaliert mit Strukturen der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Dadurch erhöht sich die Fluoreszenz um das 20-30fache. PI kann Versuchstieren intravenös (i.v.) appliziert werden und tote Zellen in-vivo markieren [Unal Cevik und Dalkara, 2003]. Diese Markierung kann in einer histologischen Auswertung des Gewebes mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Bei paralleler histologischer Detektion des mit einem fluoreszierenden Signal (Cy5.5, s. u.) markiertem Ax5 und PI lässt sich die Verteilung der beiden Zelltodmarker vergleichen.

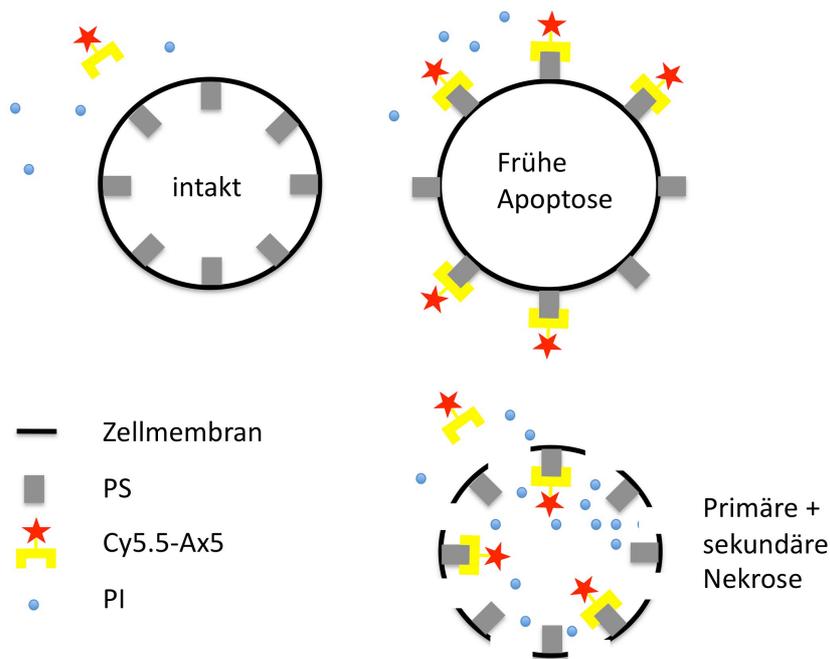


Abb. 5: Möglichkeiten der mit fluoreszierendem Cy5.5 (rot) markiertem Ax5 (gelb) und PI (blau) in einer intakten, einer früh apoptotischen und einer primär und sekundär nekrotischen Zelle.

Eine zusätzliche histologische Kontrolle bietet das TdT-mediated dUTP-Biotin-nick end labeling (TUNEL), welches vielfach als histologischer Schadensmarker eingesetzt wird. Dabei werden die nukleären DNA-Brüche an ihrer 3'-OH-Bruchstelle (= nick end) durch die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) erkannt. TdT katalysiert eine Schablone-unabhängige Addition von Nukleotid-Triphosphaten. Als Substrat dient das Digoxigenin-konjugierte Desoxyuridin (dUTP). Die inkorporierten dUTP-Komplexe können somit mittels einem anti-Digoxenin-Antikörper nachgewiesen werden [Gavrieli et al., 1992]. An diesem Antikörper kann Fluorescein (FITC), ein grün fluoreszierender Farbstoff konjugiert werden. Dieser kann mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden und dient als weitere Validierung der Ax5 Markierung. Eine parallele Untersuchung von Ax5, PI und TUNEL-Färbung ist in der Literatur nicht beschrieben.

Ein großer Vorteil Ax5 als Ligand für die Visualisierung des Zelltodes zu benutzen, liegt in seiner großen Variabilität an Bindungsmöglichkeiten für signalgebende Markierungen. Durch Variationen von Ax5 werden diese Bindungsmöglichkeiten zusätzlich erweitert. Es liegen radioaktive, eisenhaltige und fluoreszierende Markierungen vor [Kietselaer et al., 2003; Sosnovik et al., 2005].

1.7 Das Signal: Der nah-infrarot Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5

Der nah-infrarot Fluoreszenz (NIRF) Farbstoff Cy5.5 hat ein Absorptionsmaximum bei 673 nm und ein Emissionsmaximum bei 692 nm. Dieser Farbstoff wurde bereits, wie in zahlreichen Arbeiten beschrieben, erfolgreich für die nicht-invasive Fluoreszenzbildgebung von biologischen Prozessen verwendet [Wunder et al., 2005]. Die Gründe hierfür liegen in der geringen Toxizität und Photoaktivität, in der hohen Fluoreszenzquantenausbeute und pH-Stabilität des Farbstoffs und der chemisch leichten Koppelbarkeit an Proteine [Klohs et al., 2008a]

Bei der Fluoreszenzbildgebung wird ein Fluoreszenzfarbstoff durch Licht angeregt. Beim Übergang vom Anregungszustand zurück in den Grundzustand wird Licht emittiert. Das nah-infrarot Licht rangiert im Spektrum von etwa 650 nm bis ca. 900 nm und eignet sich für die nicht-invasive optische Bildgebung ("diagnostisches Fenster" siehe Abbildung 6), da in diesem Wellenlängenbereich die Absorption von Licht in Geweben, vor allem aber von Wasser und Hämoglobin am geringsten ist. Unter 650 nm ist die Penetrationstiefe des Lichtes limitiert, vor allem aufgrund des hohen Grades an endogenen Absorbern wie Oxy- und Deoxyhämoglobin, Lipiden und Wasser. Außerdem ist in einem Bereich unter 650 nm die Autofluoreszenz des Gewebes hoch [Ntziachristos et al., 2003].

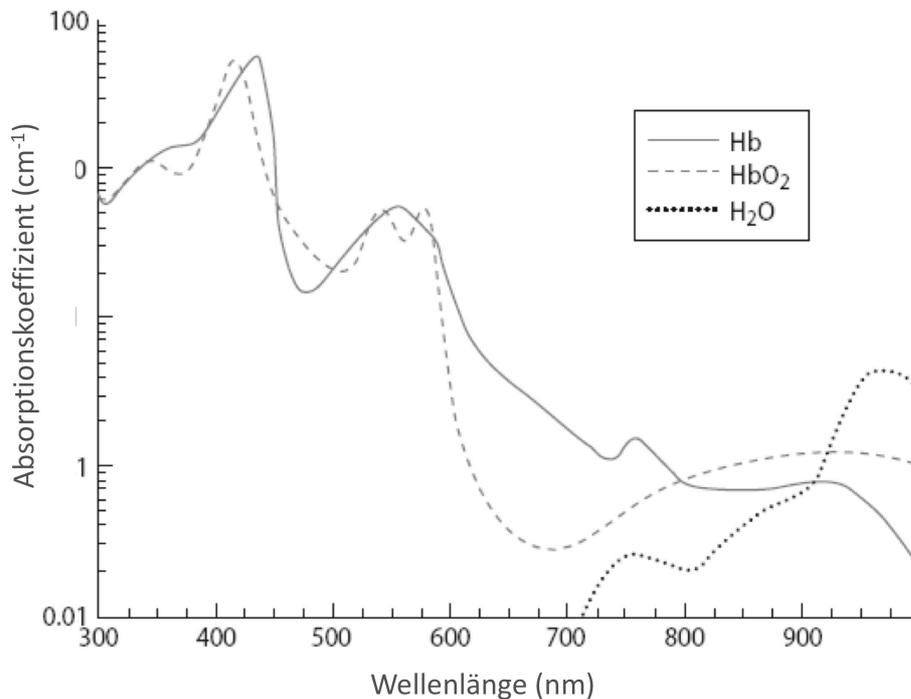


Abb. 6: Die Abbildung zeigt die Absorption des Desoxyhämoglobin (Hb), Oxyhämoglobin (HbO₂) und Wasser (H₂O) in Abhängigkeit der Wellenlänge des Lichts. Etwa zwischen 650 nm und 900 nm befindet sich das diagnostische Fenster der NIRF-Bildgebung (Modifiziert nach [Klohs et al., 2008a])

Cy5.5 kann an Ax5 gekoppelt werden und eignet sich somit als signalgebende Komponente für Ax5, welches dann mit einem NIRF-Bildgebungssystem detektiert werden kann.

1.8 Das Detektionssystem: Nicht-invasive fluoreszenzoptische Bildgebung im nah-infrarot Bereich

Für die nicht-invasive fluoreszenzoptische Bildgebung stehen planare („Fluorescence Reflectance Imaging“, FRI) sowie tomographische Verfahren („Fluorescence Mediated Tomography“, FMT) zur Verfügung. Bei der Fluoreszenzbildgebung befindet sich das zu untersuchende Objekt in einer Dunkelkammer. Der injizierte fluoreszierende molekulare Marker wird mit einer Lichtquelle, im typischen Falle einem Laser, angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wird mit einer hoch-sensitiven Kamera detektiert [Klohs et al., 2006]. Diese befindet sich bei FRI auf der gleichen Seite wie die Kamera (siehe Kap. 2.4). Diese Kameras sind meist „Charged coupled device“ (CCD) Kameras, deren

Detektoren aus feinen Silikonkristallen bestehen. Diese konvertieren Lichtphotonen in elektronische Signale, wobei äußerst geringe Energien registriert werden können. Vorgeschaltete Filtersysteme trennen dabei das Anregungslicht und das Emissionslicht und tragen somit zu einer Reduzierung des Hintergrundsignals bei. Die Signale der planaren Verfahren sind nicht ortskodiert sondern oberflächengewichtet, d.h. die genaue Lokalisation des aus dem Inneren kommende Signals ist nicht bestimmbar und Signale gleicher Intensität aus unterschiedlichen Tiefen liefern unterschiedliche Intensitäten auf dem Fluoreszenzbild [Bremer et al., 2003; Ntziachristos, 2006]. Die hohe Sensitivität der optischen Bildgebung im NIRF Spektrum kann mit morphologischen Bildgebungsverfahren, wie z. B. mit der CT kombiniert werden [Weissleder und Ntziachristos, 2003].

Dem gegenüber steht die Möglichkeit einer genauen Ortsdetektion durch die dreidimensionale FMT. Dabei wird das zu untersuchende Objekt von mehreren räumlich definierten Lichtquellen angestrahlt und die aufgenommenen Bilder drei-dimensional rekonstruiert. Die FMT ist noch in der Entwicklungsphase [Bourayou et al., 2008; Ntziachristos et al., 2005]. Die FRI wurde in der nicht-invasiven molekularen Bildgebung erfolgreich eingesetzt, z. B. in Tierexperimenten mit Tumoren [Bremer et al., 2001], bei kardiovaskulären Erkrankungen [Jaffer und Weissleder, 2005], Arthritis [Wunder et al., 2005] und für die Darstellung der Inflammation beim Schlaganfall [Klohs et al., 2008b].

Vorteile der Fluoreszenztechnik für die experimentelle Forschung sind die hohe Sensitivität, die niedrigen Kosten, die schnellen Aufnahmezeiten, sowie die Möglichkeit einer anschließenden Untersuchung der Verteilung des molekularen Markers in der Histologie mit der Fluoreszenzmikroskopie. Dadurch ist es möglich kostengünstig und schnell die Eigenschaften eines Liganden zu charakterisieren und zu überprüfen [Wunder und Klohs, 2008a].

Das in unserem Labor entwickelte NIRF-Bildgebungssystem zeigt eine Sensitivität von maximal 10^{-12} mol des fluoreszierenden Farbstoffs Cy5.5 auf [Klohs et al., 2006].

Die Abbildung 7 zeigt zusammenfassend die Vorgehensweise bei der Testung der Eignung von Ax5 als Schadensmarker im Schlaganfall-Tiermodell.

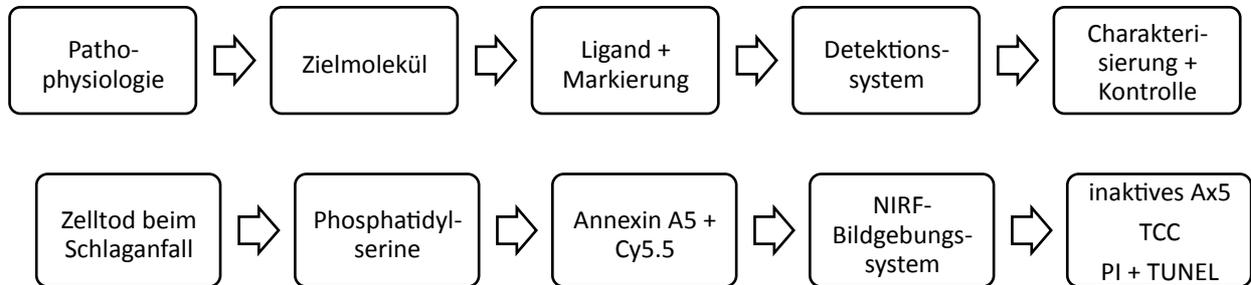


Abb. 7: In dieser Arbeit durchzuführende Schritte bei der Testung von Ax5 als einen molekularen Marker für den Zelltod beim ischämischen Schlaganfall.

1.9 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit

Der ischämische Schlaganfall zeigt hohe Inzidenz- und Mortalitätsraten auf. Die Therapiemöglichkeiten sind limitiert. Für die Klinik könnte eine spezifische nicht-invasive Bildgebung des Zelltodes eine genauere Angabe des Gewebeschadens im Schlaganfallkern ermöglichen, als die bereits oben erwähnte derzeit benutzte diffusionsgewichtete MRT (Darstellung des zytotoxischen Ödems). Dadurch verspricht man sich eine genauere Abgrenzung der Penumbra, wodurch mehr Patienten von einer Thrombolyse nach Ablauf des 4,5 Stunden Zeitfensters profitieren könnten als bisher (nur ca. 6 % der Patienten) [Maulaz et al., 2005]. Zudem kann die Einführung eines spezifischen molekularen Markers für den Gewebeschaden beim Schlaganfall einen wichtigen Beitrag zu einem verbesserten Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung leisten.

In unserer Arbeitsgruppe ist die nicht-invasive Bildgebung von dem proinflammatorischen CD40 Rezeptor und Matrixmetalloproteinasen (Inflammationsmarker) sowie die Visualisierung des Integritätsverlustes der Blut-Hirn-Schranke beim ischämischen Schlaganfall im Kleintier mit einer NIRF-Bildgebung etabliert [Klohs et al., 2009; Klohs et al., 2008b; Klohs et al., 2009a]. In Anlehnung an Abbildung 3 ist als nächster Schritt die Visualisierung des Zelltodes konsequent.

In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Cy5.5-Ax5 nicht-invasiv den Zelltod beim ischämischen Schlaganfallmodell der Maus (MCAO-Modell, middle cerebral artery occlusion) mit fluoreszenzoptischer Bildgebung visualisieren kann.

Zur Überprüfung der Hypothese wurden folgende Ziele formuliert:

- Nicht-invasive Detektion des Zelltodes beim MCAO-Modell der Maus mit Cy5.5-Ax5 und einem planaren NIRF-Bildgebungssystem
- Ex-vivo Beschreibung der Verteilung von Cy5.5-Ax5 im Gehirn
- Einsetzen einer nicht-invasiven und ex-vivo Kontrolle mit inaktivem Cy5.5-Ax5, um unspezifische Anreicherungen von Cy5.5-Ax5 aufzuzeigen
- Ex-vivo Kontrolle der Verteilung von Cy5.5-Ax5 mit einer TTC-Färbung am Gehirnschnitt
- Histologische Kontrolle der Spezifität und Verteilung von Cy5.5-Ax5 mit:
 - in-vivo appliziertem PI (Zelltodmarker)
 - immunhistochemische Färbung mit einer TUNEL-Färbung (Zelltodmarker)
 - morphologische Darstellung mit einer Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

2. Methoden

2.1 Versuchsprotokolle

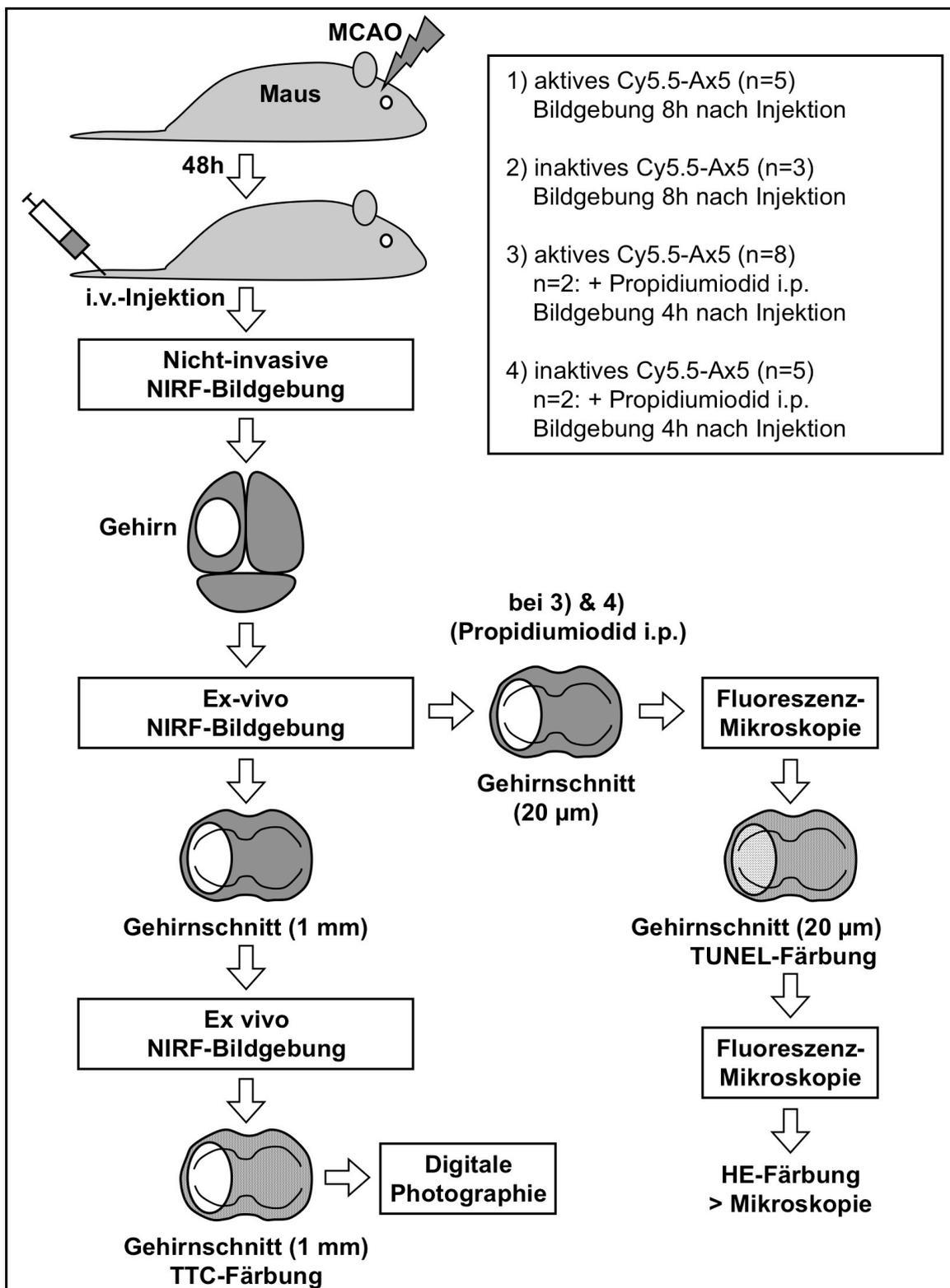


Abb. 8: Beschreibung der Versuchsgruppen und des Versuchsablaufs (i.v. = intravenös; i.p. intraperitoneal).

Eine Übersicht des Versuchsprotokolls zeigt Abbildung 8. 48 Stunden nach Ischämieinduktion (MCAO) wurden je nach Gruppe aktives oder inaktives Cy5.5-Ax5 injiziert. Zusätzlich erhielten in der Gruppe 3 und 4 jeweils 2 Tiere PI intraperitoneal (i.p.). Nach Zirkulationszeiten von 4 bzw. 8 Stunden wurde eine nicht-invasive NIRF-Bildgebung durchgeführt. Nach Extraktion der Gehirne erfolgte eine ex-vivo NIRF-Bildgebung. Daraufhin wurde eine TTC-Färbung der ausgewählten Gehirnschnitte durchgeführt bzw. eine histologische Untersuchung eingeleitet.

2.2 Ischämieinduktion

Die Versuchsreihen unterlagen den Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen des Tierschutzgesetzes und wurden vom Landesamt Berlin für Gesundheit und Soziales genehmigt (Antragsnummer G0229/05 vom 6.7.2005).

Als Tiermodell wurde das MCAO-Modell benutzt [Prinz et al., 2008]. Die Ischämieinduktion im Versorgungsbereich der linken Arteria (A.) cerebri media entsteht durch ihren temporären Verschluss. Die Mäuse wurden mit Halothan im N₂O-O₂-Gasgemisch (70 % N₂O und 30 % O₂) mittels eines Fluotec 3 Verneblers (Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) und einer Gesichtsmaske anästhesiert. Die Narkose wurde mit 1.5 % Halothan eingeleitet und mit 1.0 % fortgesetzt. Durch eine Mittellinieninzision der Haut am Hals und Präparation der Muskeln erfolgte die Darstellung der linken A. carotis communis, der A. carotis externa und der A. carotis interna. Die A. carotis communis und die A. carotis externa wurden distal permanent mit einem Faden ligiert (Suprema, Berlin, Deutschland). Ein 11 mm langes 8-0 Nylon Monofilament, das mit einer Silikonschicht überzogen wurde (Xantopren und Elastomer Activator, Bayer Dental, Osaka, Japan), wurde in die A. carotis communis eingeführt und über die A. carotis interna in die A. cerebri media bis zum Abgang der A. cerebri anterior am Circulus Willisii platziert, was eine Ischämie im Versorgungsgebiet der linken A. cerebri media auslöste. Nach einstündiger Ischämie wurde das jeweilige Filament wieder entfernt, um eine Reperfusion zu ermöglichen. Hierzu wurden die Tiere kurz anästhesiert.

2.3 Synthese von fluoreszenzmarkiertem Annexin A5

Die aktiven und inaktiven Cy5.5-Ax5 Proben wurde von Prof. Dr. Eyk Schellenberg am Institut für Radiologie Charité-Universitätsmedizin Berlin synthetisiert. Die Ax5 Konzentration wurde mit einem Bicinchoninic acid Assay und die Cy5.5-Konzentration photometrisch ermittelt. Cy5.5 konnte mit einer über 80 prozentigen Markierungseffizienz an Ax5 gekoppelt werden. Die Inaktivierung erfolgt über eine Überladung von Ax5 mit Cy5.5 (im Mittel 2 Cy5.5 auf 1 Ax5)(Für eine detaillierte Anleitung siehe [Schellenberger et al., 2004]).

2.4 Injektion der Proben

Die Mäuse wurden 48 Stunden nach Ischämie mit Halothan im N₂O-O₂-Gasgemisch (70 % N₂O und 30 % O₂) für die Injektion anästhesiert. Die Zirkulationszeit der Proben betrug 4 bzw. 8 Stunden, wobei die Injektion der Proben i.v. über die Schwanzvene mittels einer Insulinspritze (BD Plastipak, Becton Dickinson, Madrid, Spanien) erfolgte. Die Injektion des PI (Molecular Probes, Eugene, USA) erfolgte i.p. mittels einer Insulinspritze. Es wurden 7 nM Ax5 pro Tier injiziert. Die Dosis von PI betrug 20 mg/kg aufgelöst in 0,9 % Natriumchloridlösung (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

2.5 Aufbau des NIRF-Bildgebungssystems



Abb. 9: Versuchsaufbau 1) Dunkelkammer 2) Laserlicht 3) Maushalterung 4) Filtersystem 5) Objektiv 6) Kamera

Das NIRF-Bildgebungssystem besteht aus einer Dunkelkammer, einer Lichtquelle zur Anregung der Fluoreszenz (Laser) und einem Detektionssystem (CCD-Kamera). Die Anregungsquelle besteht aus einem CW-Diodenlaser mit der Wellenlänge 670 nm (Roithner Lasertechnik, Wien, Österreich). Das Anregungslicht wird mit Hilfe von zwei Lichtfasern (Durchmesser 250 μm , Loptek, Berlin, Deutschland) in die Dunkelkammer geleitet. Somit wird das zu untersuchende Objekt von zwei überlappenden Lichtkegeln (Abstand ca. 10 cm) mit einem Durchmesser von ca. 4 cm beleuchtet. Das Detektionssystem besteht aus einer CCD Kamera (Vers Array 512B, Roper Scientific Inc., Duluth, USA), welche mit einem Linsensystem ausgestattet ist (Nikkor Makro Linsen, $f = 50 \text{ mm}$, $f/1.2$, Nikon, Düsseldorf, Deutschland).

Zur Optimierung des Systems wurden Anregungsfilter mit 680 nm und vor dem Detektionssystem Interferenzfilter mit 710 nm installiert (Andover Corp., Salem, USA).

Die Aufnahmezeiten betragen 60-120 s abhängig von der Signalintensität. Die aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurden mit dem Programm Winview/32 (Copyright 1996-1999, 2000-2003 Roper Scientific) dargestellt und als 16-bit tagged image file (TIF) für die weitere Bearbeitung gespeichert. Dabei wurden alle Bilder auf 1 Sekunde Aufnahmezeit normiert.

2.6 Nicht-invasive Bildgebung

Für die nicht-invasive Bildgebung wurden die Mäuse mit Halothan im N_2O - O_2 -Gasgemisch (70 % N_2O und 30 % O_2) anästhesiert und auf eine Halterung fixiert. Die Anästhesie wurde während der gesamten Bildgebung aufrecht erhalten.

2.7 Auswertung und Statistik der nicht-invasiven Bilder

Die nicht-invasiven Bilder wurden durch ROI-Analyse (ROI, region of interest) ausgewertet. Die ROIs wurden entsprechend der anatomischen Lage der Gehirnhälften definiert. Eine detaillierte Beschreibung der Lage der ROIs zeigt die Abbildung 10 A (siehe Kap. 3.1). Die Signalintensität in einer ROI errechnet sich aus dem Mittel aller Pixel der normalisierten Bilder. Es wurde der Quotient aus ipsilateralen und kontralateralen ROI gebildet. Dieser Quotient wird im Folgenden als "target to background ratio" (TBR) bezeichnet. Zum statistischen Vergleich der TBR zwischen den Gruppen mit injiziertem aktiven Ax5 und inaktivem Ax5 wurde der unpaired Student's t-test verwendet.

2.8 Ex-vivo Bildgebung

2.8.1 Gehirne und Gehirnschnitte

Nach der nicht-invasiven Bildgebung wurden die Mäuse in tiefer Narkose mit einer Schere dekapitiert. Das Gehirn wurde anschließend entnommen und mit dem NIRF-Bildgebungssystem eine Aufnahme durchgeführt. Die für die Histologie ausgewählten Gehirne (siehe Abbildung 8) wurden nach der Aufnahme mit Hilfe von flüssigem Stickstoff tiefgefroren und zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Die für die TTC-Färbung ausgewählten Gehirne wurden in 1 mm dicke Scheiben geschnitten und mit dem NIRF-Bildgebungssystem aufgenommen.

2.8.2 TTC-Färbung

Direkt nach der NIRF-Aufnahme der Gehirnschnitte wurde bei einer Auswahl von Gehirnschnitten (siehe Abbildung 8) eine TTC Färbung durchgeführt. Die Gehirnschnitte wurden mit einer 2 % TTC-Lösung (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) 30 min lang inkubiert. Anschließend wurden die Gehirnschnitte digital fotografiert.

2.9 Histologie

2.9.1 Annexin A5 und Propidiumiodid

Die eingefrorenen Gehirne wurden am Kryostat (Microm, Heidelberg, Deutschland) geschnitten. Die 20 µm dicken koronaren Sektionen wurden auf kurz vorgewärmte Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgenommen. Die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie der Gehirnschnitte wurde mit einem Leica DMRA Mikroskop (Leica Microsystems, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe der Leistung 100 Watt (Osram GmbH, München, Deutschland) eingesetzt. Tabelle 1 zeigt die eingesetzten Filtersysteme. Für die Fluoreszenzdetektion wurde eine stickstoffgekühlte CCD Kamera (Vers Array 512B, Roper Scientific Inc., Duluth, USA) verwendet. Die Aufnahmezeiten von 1 s bis 30 s richteten sich nach der Fluoreszenzintensität des zu untersuchenden Objektes.

Tabelle 1: Eingesetzte Filter in der Fluoreszenzmikroskopie abhängig vom zu visualisierenden Marker

Marker	Wellenlänge des Anregungsfilters (nm)	Wellenlänge des Sperrfilters (nm)	Aufnahmezeit (s)
Cy5.5	682	721	5-30
PI	546	567	1
FITC (TUNEL)	470	522	1

Die Präparate wurden bei 10facher Vergrößerung fotografiert. Dabei wurden ipsilateral des Schlaganfalls die Regionen Kortex und Thalamus gewählt (s. u.). Nach Bildaufnahmen im Cy5.5 und PI-Kanal, wurde derselbe Schnitt für die anschließende TUNEL-Färbung weiterverarbeitet und anschließend die selben Regionen im Kortex und Thalamus mit der CCD Kamera fotografiert. Für die histologische Abbildung im Ergebnisteil wurde eine Grenzregion und für die Darstellung der Verteilung eine Ventrikelregion ipsilateral vom Schlaganfall gewählt.

2.9.2 TUNEL-Färbung

Für die Detektion von geschädigten Zellen, wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt. Es wurde ein kommerziell erhältlicher Kit "ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection" (Chemicon International, Temecula, USA) verwendet. Hierauf beziehen sich die Begriffe "Equilibration Buffer", "Working Strength Tdt Enzyme", "Working Strength Stop/Wash Buffer" und "Anit-Digoxigenin Conjugate".

- Fixierung der Schnitte in 1 % Paraformaldehyd (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in Phosphat buffered Saline (PBS) (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland), für 10 min bei Raumtemperatur
- zweimaliges Waschen (je 5 min in PBS)
- Zweitfixierung in vorgekühltem Ethanol-Acetonsäure im Verhältnis von 2:1 für 5 min bei -20°C
- zweimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- nach Abtropfen Zugabe von 75 µl je Schnitt des Equilibration Buffer und Inkubation für 10 s bei Raumtemperatur
- nach kurzem Abtropfen Applikation von 55 µl je Schnitt des Working Strength Tdt Enzyme und Inkubation für 1 h bei 37°C
- Waschen in Working Strength Stop/Wash Buffer für 10 min bei Raumtemperatur
- dreimaliges Waschen, je eine min in PBS
- Inkubation von 65 µl pro Schnitt des Anit-Digoxigenin Conjugate für 30 min bei Raumtemperatur
- viermaliges Waschen in PBS für je 2 Minuten

2.9.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur morphologischen Begutachtung wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Hier ist hervorzuheben, dass kein Folgeschnitt, sondern derselbe Schnitt wie in den vorher durchgeführten Aufnahmen (Ax5, PI und TUNEL) verwendet wurde.

- Trocknen der Schnitte für 30 min
- 10 min in 100 % Ethanol (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland)
- 4 s in destilliertem (DI) Wasser waschen
- HCL-Ethanol für 1 s (2 mL HCL 25 % + 200 ml Ethanol 96 %)
- 10 s in DI Wasser waschen
- 3 min Bläuen (1 % NaHCO₃ : 2 g NaHCO₃ / 200 ml DI Wasser)
- 4 s in DI Wasser waschen
- 1 min Eosin (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 2 s in DI Wasser waschen
- 5 s in Alkoholreihe (70 % - 96 % - 100 % Ethanol)
- 10 s Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Die Bildaufnahme der HE-Färbung erfolgte mit einer digitalen Kamera DC200 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland).

2.9.4 Auswertung Histologie

Die Fluoreszenzbilder wurden mit dem Programm Winview/32 in TIF-Dateien konvertiert. Für die Auszählung der verschiedenen Markierungsmöglichkeiten einer Zelle im Thalamus und Kortex wurde das Programm Adobe Photoshop (San Jose, California, USA) verwendet. Die Bildinformationen eines Schnitts (Ax5, PI, TUNEL, HE) wurden überlagert und ein Ausschnitt von 250 µm x 250 µm betrachtet. Dadurch konnte in diesem Auszählungsfeld die Kolokalisation einer Zelle mit den 3 Signalen Ax5, PI und TUNEL bestimmt werden.

Es wurden 5 histologische Gehirnschnitte aus zwei Versuchstieren mit Ax5 verwendet (siehe Abbildung 8, Tiergruppe 3). Das Ergebnis wurde tabellarisch aufgetragen. Die HE-Färbung diente zur morphologischen Orientierung.

Die nicht-invasiven Aufnahmen zeigten sowohl nach Applikation von aktivem Ax5, als auch nach Applikation von inaktivem Ax5 hohe Signalintensitäten zentral in Form eines Dreiecks, welches morphologisch den Confluens sinuum darstellt. Von dieser dreieckigen Struktur ausgehend befand sich in der Mittellinie des Schädels eine signalreiche Linie, welche den Sinus sagittalis darstellt (Abbildung 10 A und C). Diese Signale gehen auf in der Zirkulation befindliches Cy5.5-Ax5 zurück.

In Abbildung 10 B und D sind repräsentative Aufnahmen der entnommenen Gehirne dargestellt. Über der ipsilateralen Hemisphäre des Gehirns der Maus mit aktivem Ax5 wurde eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität detektiert, als über der kontralateralen Seite (D). Eine höhere Signalintensität über der ipsilateralen Hemisphäre gegenüber der kontralateralen Hemisphäre wurde nach Entnahme der Gehirne auch nach Applikation von inaktivem Ax5 festgestellt (B). Jedoch ist der Unterschied deutlich geringer, als nach Applikation von aktivem Ax5. Die geringe, aber messbare Anreicherung von inaktivem Ax5 im Schlaganfall weist auf eine unspezifische Aufnahme von aktivem Ax5 ins ischämische Gewebe hin. Das inaktive Ax5 Signal ist jedoch so gering, dass es nicht-invasiv nicht detektierbar war.

3.2 Target-to-background-ratios

Für jede Maus wurden die TBRs anhand der nicht-invasiven Fluoreszenzaufnahmen berechnet, in dem die Fluoreszenzintensitäten der ipsilateralen ROIs durch die der kontralateralen ROIs geteilt wurden. In einem durchgeführten Student's t-test wurde ein signifikanter Unterschied zwischen MCAO-Mäusen mit aktivem Ax5 zu MCAO-Mäusen mit inaktivem Ax5 mit einem p-Wert kleiner 0,05 festgestellt. Es war kein signifikanter Unterschied der TBRs zwischen 4 und 8 Stunden Zirkulationszeit bei MCAO-Mäusen mit aktiven Ax5 erkennbar.

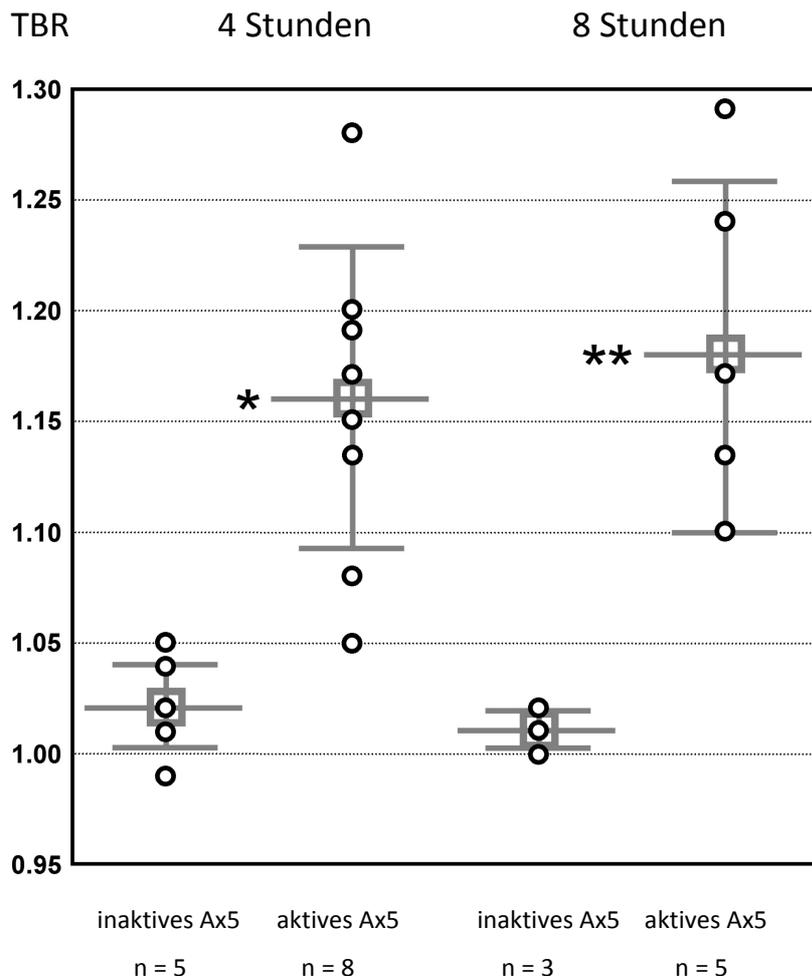


Abb. 11: TBRs ermittelt anhand der ROI-Analyse der nicht-invasiven Fluoreszenzaufnahmen nach Applikation von inaktivem und aktivem Ax5 4 und 8 Stunden nach Injektion, * $p = 0.002$ ** $p = 0,008$

3.3 Ex-vivo Gehirnschnitte und TTC-Färbung

Die in der Schlaganfallregion sagittal geschnittenen Gehirnscheiben der entnommenen Gehirne zeigten in der NIRF-Aufnahme hohe Fluoreszenzintensität ipsilateral im Schlaganfallgebiet (repräsentativ in Abbildung 12). Die Signalintensität war in der Versuchsgruppe mit aktivem Ax5 deutlich höher, als in der Versuchsgruppe mit inaktivem Ax5. Die anschließend durchgeführte TTC-Färbung bestätigte den ischämischen Zellschaden ipsilateral (nicht rot eingefärbt). Diese Fläche korrelierte gut mit dem NIRF-Signal des aktiven bzw. inaktiven Ax5-Cy5.5.

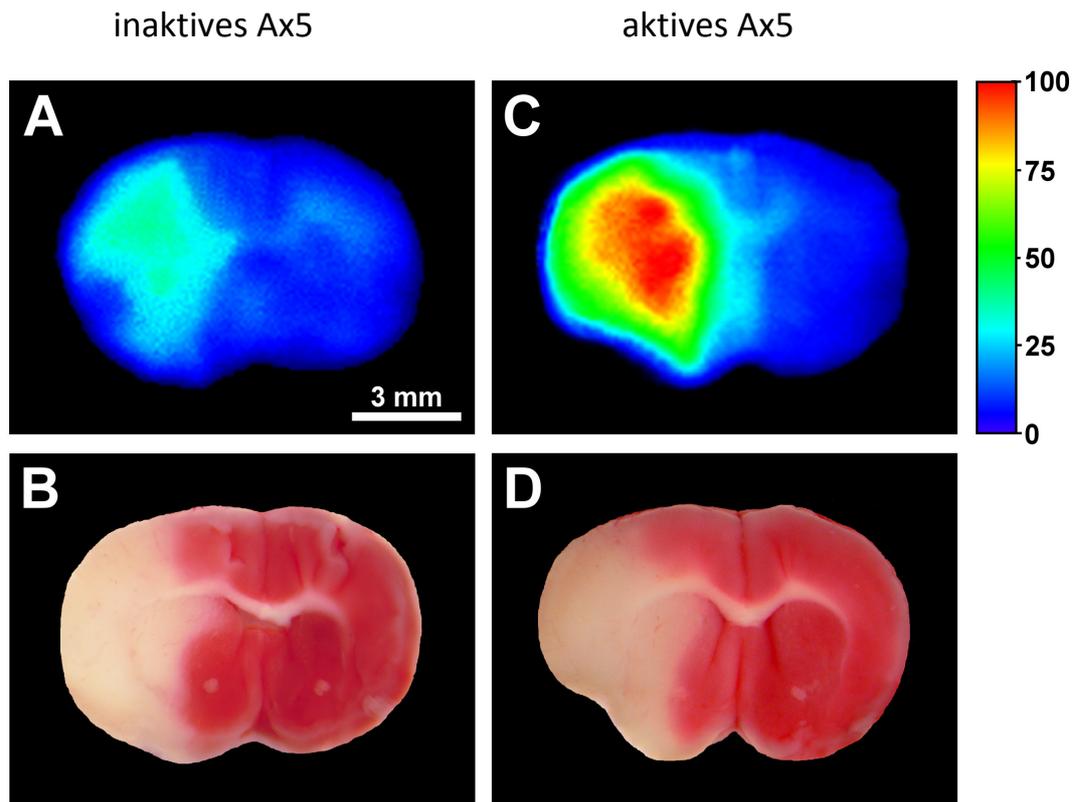


Abb. 12: Repräsentative ex-vivo NIRF-Bilder von Gehirnschnitten von MCAO-Mäusen nach Applikation von inaktiven (A) und aktiven (C) Cy5.5-Ax5 mit den entsprechenden TTC-Färbungen (B) und (D).

3.4 Histologie

Abbildung 14 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Gehirnschnitten im Bereich der Schlaganfallgrenze von MCAO-Mäusen nach i.v. Applikation mit Cy5.5-markiertem aktivem bzw. inaktivem Ax5 (nah-infrarot Fluoreszenz, rot eingefärbt) bei gleichzeitiger i.p. Injektion von PI (Rotfluoreszenz, blau eingefärbt). Die Schnitte wurden zunächst im Fluoreszenzmikroskop untersucht und Cy5.5-Ax5 und PI detektiert. Anschließend wurden dieselben Schnitte mit der TUNEL-Färbung behandelt und danach das TUNEL-Signal im Fluoreszenzmikroskop detektiert (FITC-Kanal, grün eingefärbt). Letztlich wurde der Schnitt mit HE gefärbt und mit einem Lichtmikroskop untersucht. Die erste Reihe (A) zeigt Schnitte einer Maus nach Injektion von aktivem Ax5 und PI. Die zweite Reihe (B) stellt eine Vergrößerung des in 14 A umrahmten Bereiches dar. Die untere Reihe (C) zeigt Schnitte einer Maus nach Injektion von inaktivem Ax5 und PI.

Die Schlaganfallgrenze ließ sich anhand der Verteilung des injizierten PI, der TUNEL-Färbung und der HE-Färbung gut erkennen. Nach Applikation von aktivem Ax5 fanden sich im Bereich des Schlaganfalls (auf den Schnitten links zu sehen) eine Vielzahl aktiver Ax5-positiver, PI-positiver bzw. TUNEL-positiver Zellen. Auch große Gefäße zeichnen sich durch eine hohe Cy5.5-Ax5 Fluoreszenzintensität aus. Nach Injektion von inaktivem Cy5.5-Ax5 war bei MCAO-Mäusen ein Cy5.5 Signal nur im Bereich großer Gefäße zu detektieren. Vergleicht man die Verteilung von aktivem Ax5 mit der Verteilung von injizierten PI und der TUNEL-Färbung fällt auf, dass ein Großteil der Zellen, die für aktives Ax5 positiv sind, auch PI- und TUNEL-positiv sind. Dies wird besonders anhand der Ausschnittsvergrößerung (B) sichtbar.

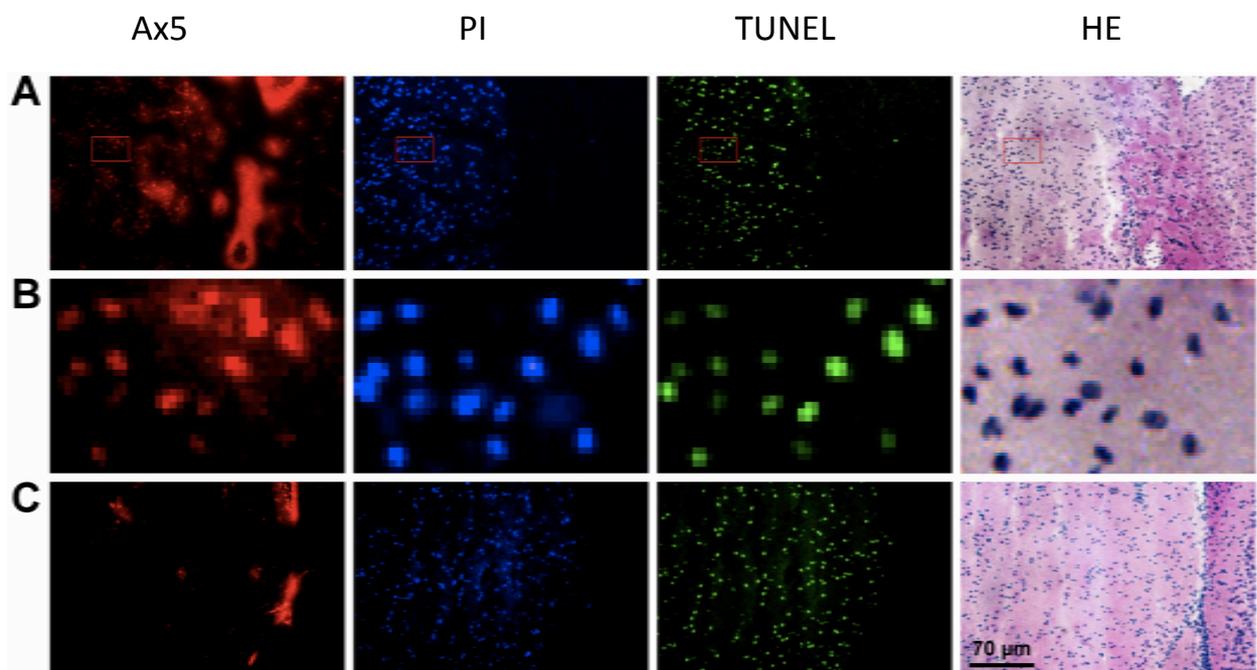


Abb. 13: Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder der Histologie im Bereich der Schlaganfallgrenze: Reihe A zeigt in 10facher Vergrößerung aktives Ax5 und vergleicht dessen Verteilung mit der Verteilung von PI, der TUNEL und der HE-Färbung; Reihe B zeigt einen Vergrößerungsausschnitt, welcher in Reihe A mit einem roten Rechteck markiert ist; Reihe C zeigt in 10facher Vergrößerung die Verteilung von inaktivem Ax5 als Kontrollgruppe verglichen mit PI, der TUNEL- und der HE-Färbung; Die vier Abbildungen einer Reihe stammen vom selben Schnitt.

Im nächsten Schritt wurde das Färbemuster der Zellen in repräsentativen Regionen im Thalamus und Kortex bestimmt (siehe Tabelle 2). Dabei wurden die verschiedenen

Markierungsmöglichkeiten (Cy5.5-Ax5, PI, TUNEL) berücksichtigt. In den Auszählregionen waren im Mittel 76,6 % der Zellen im Thalamus und 69 % der Zellen im Kortex positiv für zumindest eine der drei Färbungen. 17,8 % der geschädigten Zellen im Thalamus und 15,5 % im Kortex waren Ax5-negativ und PI- und TUNEL-positiv oder nur PI-positiv. Dies zeigt, dass Ax5 einen großen Anteil (etwa 75 %), nicht aber den gesamten Anteil der geschädigten Zellen markiert. Etwa 25 % der geschädigten Zellen war Ax5-negativ. 1,4 % der Zellen im Thalamus und 1,7 % der Zellen im Kortex waren nur Ax5-positiv ohne Kolo-kalisation mit einem der anderen beiden Zell-todmarker (PI- und TUNEL-negativ).

Tabelle 2: Anteil der Zellen ohne Färbung und mit Färbung in den Regionen Thalamus und Kortex unter Berücksichtigung der verschiedenen Markierungen: keine Markierung, Ax5, PI und TUNEL; Stabw = Standardabweichung

<i>% Zellen</i>	<i>Thalamus</i>	<i>Kortex</i>
	<i>Mittelwert ± Stabw</i>	<i>Mittelwert ± Stabw</i>
<i>keine Markierung</i>	<i>23.4 ± 7.0</i>	<i>31.0 ± 9.0</i>
<i>Ax5 + PI + TUNEL</i>	<i>49.6 ± 9.0</i>	<i>47.0 ± 8.4</i>
<i>Ax5 + PI</i>	<i>8.1 ± 3.7</i>	<i>4.4 ± 1.3</i>
<i>Ax5</i>	<i>1.4 ± 0.7</i>	<i>1.7 ± 0.5</i>
<i>PI + TUNEL</i>	<i>6.6 ± 4.0</i>	<i>7.0 ± 2.6</i>
<i>PI</i>	<i>11.2 ± 3.3</i>	<i>8.5 ± 2.8</i>

3.5 Verteilung

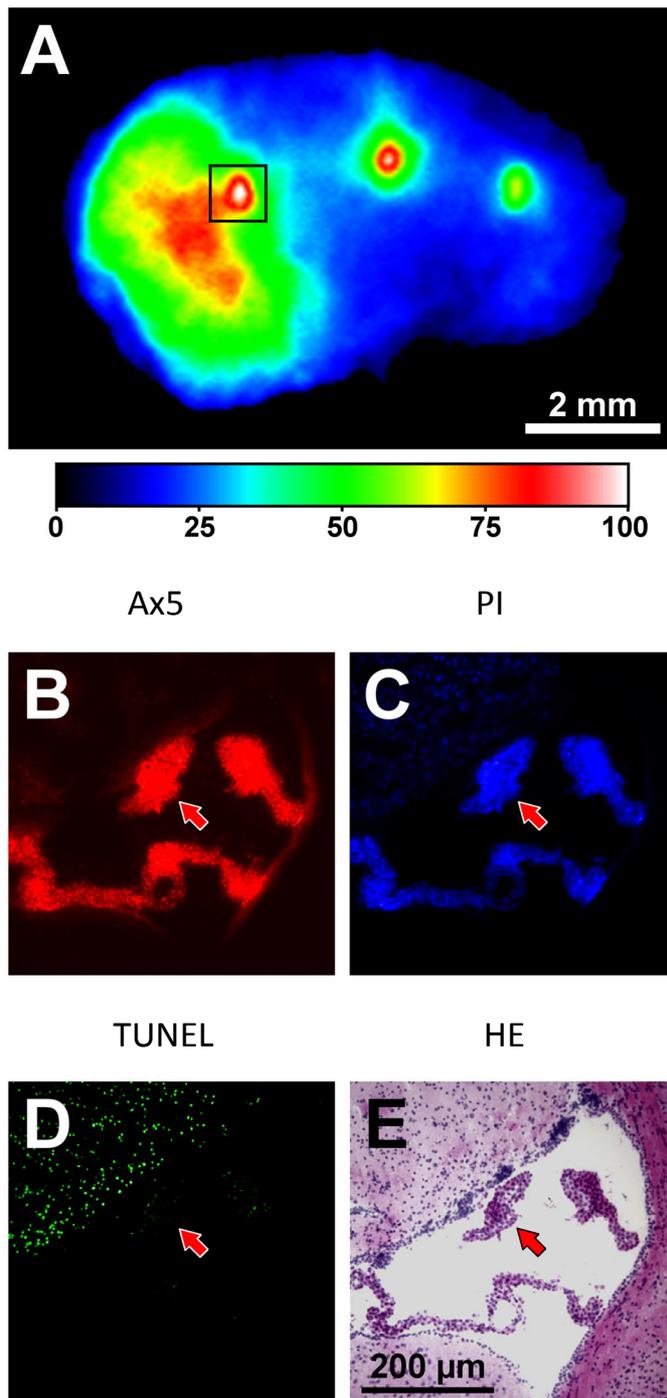


Abb. 14: A zeigt eine NIRF-Aufnahme eines Gehirnschnitts in Höhe des Ventrikelsystems einer MCAO-Maus nach Applikation von aktivem Ax5; Der schwarze Kasten umrahmt den linken Ventrikel im Schlaganfallgebiet und zeigt die Region der anschließend durchgeführten Histologie auf; Die vier Abbildungen der Histologie stammen aus dem selben Schnitt; Die roten Pfeile zeigen auf Ependymzellen im Ventrikel.

In Abbildung 14 ist ein Gehirnschnitt im Bereich des Ventrikelsystems einer MCAO-Maus nach Applikation von aktivem Ax5 dargestellt. Die NIRF-Aufnahme des Gehirnschnitts zeigte eine hohe Fluoreszenzintensität, nicht nur im Bereich des Schlaganfalls, sondern ebenso im Bereich der Ventrikel und zwar sowohl ipsi- als auch kontralateral. Die histologische Darstellung des ipsilateralen Ventrikels zeigte, dass die Ependymzellen die injizierten Marker Cy5.5-Ax5 und PI gebunden bzw. aufgenommen haben. Diese Zellen waren Ax5-positiv (nah-infrarot Fluoreszenz, rot eingefärbt), sowie PI-positiv (Rotfluoreszenz, blau eingefärbt), jedoch TUNEL-negativ (FITC-Kanal, grün eingefärbt). Das gleiche Ergebnis beschreibt die histologische Begutachtung des kontralateralen Ventrikels. Diese Ax5 und PI Aufnahmen im Ventrikel sind nicht spezifisch für Zelltod, sondern stellen eine unspezifische Aufnahme dar.

4. Diskussion

Der ischämische Schlaganfall führt zunächst im Kerngebiet der Ischämie zum Absterben von Zellen. Die Penumbra ("tissue at risk") ist als der Teil des Gewebes definiert, der zwar auch von der Ischämie betroffen ist, aber mit geeigneten Therapiemaßnahmen, z. B. mit einer Thrombolyse gerettet werden kann. Das derzeit eingesetzte Verfahren zur Erfassung der Penumbraregion ist das DWI/PWI-mismatch mit der MRT. Das Verfahren ist indirekt und ermöglicht keine klare Abgrenzung der Penumbra [Paciaroni et al., 2009; Sobesky, 2009]. Neue spezifischere Verfahren, die eine direkte und zuverlässige Abgrenzung der Penumbra ermöglichen, sind daher von großer Bedeutung. Durch die Beschreibung von spezifischen Zelltodmarkern für die nicht-invasive Bildgebung könnten mehr Patienten als bisher von einer Thrombolysetherapie nach dem Zeitfenster von 4,5 Stunden profitieren. Zudem verspricht man sich mit dieser Methode ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung. Es existiert noch kein spezifischer Schadensmarker für die nicht-invasive Bildgebung von geschädigten bzw. toten Zellen beim Schlaganfall.

Ein Kandidat für einen spezifischen Schadensmarker beim Schlaganfall ist Ax5. Dieses Protein zeigt eine hohe Affinität für PS auf und bindet daher mit hoher Spezifität an geschädigte bzw. tote Zellen, da nur bei diesen Zellen PS für eine Bindung von Ax5 zugänglich wird. Ax5 wurde bereits in mehreren tierexperimentellen sowie klinischen Studien z. B. an onkologischen oder kardiovaskulären Erkrankungen erfolgreich zur Visualisierung von toten Zellen eingesetzt [Haas et al., 2004; Thimister et al., 2003]. Auch bei Schlaganfallpatienten [Blankenberg et al., 2006; Lorberboym et al., 2006] und im Schlaganfall-Tiermodell [Mari et al., 2004; Tang et al., 2007] wurde Ax5 als Schadensmarker bereits getestet. Bei keiner dieser Arbeiten wurde eine adäquate Kontrollsubstanz eingesetzt, die dem Ax5-Molekül nahe kommt, aber nicht an PS bindet und mit der unspezifische Anreicherungen von Ax5 nachgewiesen werden können. Außerdem sind die in der Literatur beschriebenen Daten zur Verteilung von Ax5 auf histologischer Ebene vor allem auch im Vergleich zu anderen Schadensmarkern lückenhaft. Ziel dieser Arbeit war es daher, neben der nicht-invasiven Visualisierung von Zelltod beim ischämischen Schlaganfall im Kleintiermodell, mit Hilfe einer Kontrollsubstanz unspezifische Bindungen von Ax5 zu erfassen und die Verteilung von Ax5 auf histologischer Ebene im Vergleich zu den Schadensmarkern PI und TUNEL-Färbung zu untersuchen.

4.1 Nicht-invasive NIRF-Bildgebung und Target-to-background-ratios

Wie die Abbildung 10 C zeigt lassen sich bei MCAO-Mäusen nach intravenöser Applikation von aktivem Cy5.5-Ax5 mit nicht-invasiver NIRF-Bildgebung über der ipsilateralen Hemisphäre höhere Fluoreszenzintensitäten als über der kontralateralen Seite nachweisen. Dies ist nach Injektion von inaktivem Cy5.5-Ax5 als Kontrolle nicht der Fall (siehe Abbildung 10 A). Mit dieser Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, die Anreicherung des Schadensmarkers Ax5 in einem Schlaganfall-Tiermodell mit nicht-invasiver NIRF-Bildgebung zu visualisieren. Derzeit sind in der Literatur nur noch zwei andere Arbeiten, die nicht-invasive Bilder der Anreicherung von Ax5 in ischämischen Gewebe im Schlaganfall-Tiermodell zeigen verfügbar. Bei keiner der beiden Arbeiten wurde eine Kontrollsubstanz eingesetzt. Es werden keine quantitativen Daten, sondern wie in dieser Arbeit Ratios zwischen ipsilateraler und kontralateraler Seite präsentiert [Mari et al., 2004; Tang et al., 2007]. Mari et al. untersuchten die Verteilung von ^{99m}Tc markiertem Ax5 in Ratten mit MCAO (2 Stunden Okklusionszeit) 4, 24, 72 und 168 Stunden nach Reperfusion mit SPECT-Bildgebung jeweils eine Stunde nach Tracerinjektion. Die SPECT-Bilder zeigen eine Traceraufnahme in beide Hemisphären, die jedoch in der ipsilateralen Hemisphäre signifikant erhöht war, insbesondere 72 Stunden nach Reperfusion [Mari et al., 2004]. Tang et al. injizierten mit ^{99m}Tc radioaktiv markiertes Ax5 Mäusen mit MCAO (45 min Okklusion). Von den Versuchstieren wurden 1, 3, 7, und 30 Tage nach der Okklusion und eine Stunde nach Applikation des radioaktiven Markers SPECT-Aufnahmen angefertigt. Diese Aufnahmen zeigen eine deutliche Anreicherung von Ax5 in der Schlaganfall-Hemisphäre im Vergleich zur kontralateralen Seite zu allen Untersuchungszeitpunkten. Diese Anreicherung korrelierte mit dem Infarktvolume[n] [Tang et al., 2007].

Die nicht-invasiven Bilder dieser Arbeit zeigen, dass selbst 4 und 8 Stunden nach Injektion von aktivem Ax5 neben der erhöhten Aufnahme im Bereich der Schlaganfall-Hemisphäre, deutliche Hintergrundsignale durch in der Zirkulation befindliches Ax5 detektiert werden können (siehe Abbildung 10 C). Diese Hintergrundsignale sind ebenso nach Applikation von inaktivem Ax5 nachweisbar (siehe Abbildung 10 A). Das Blutvolumen an der dorsalen Oberfläche des Gehirns ist durch den Sinus sagittalis superior und dem Confluens sinuum hoch. Zudem ist die in dieser Arbeit eingesetzte Fluoreszenzbildgebung oberflächengewichtet. Zirkulierendes Ax5 im venösen System

dorsal des Gehirns ist deutlich auf den nicht-invasiven Aufnahme zu erkennen und stört die Beobachtung der Anreicherung des molekularen Markers im Schlaganfallgewebe. Dennoch lassen durch die beschriebene ROI-Analyse signifikant höhere target-to-background-ratios zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hemisphäre 4 und 8 Stunden nach Injektion von aktivem Ax5, nicht jedoch nach Injektion von inaktivem Ax5, bei MCAO-Mäusen nachweisen (siehe Abbildung 11). Im Unterschied zu den von Mari et al. und Tang et al. präsentierten SPECT-Daten, ist mit dem hier beschriebenen planaren NIRF-Bildgebungssystem nicht möglich 3-dimensionale Fluoreszenzbilder vom Gehirn der Versuchstiere zu erhalten. Dies ist nur mit einem tomographischen System möglich. Ein entsprechendes Gerät, das dies ermöglicht, wurde in Kooperation der Experimentellen Neurologie Charité zusammen mit dem Berlin Neuroimaging Center entwickelt und wird zur Zeit getestet [Bourayou et al., 2008]. Das System liefert dreidimensionale Bilder. Ob jedoch eine Quantifizierung der Daten möglich ist, bleibt abzuwarten.

4.2 Ex-vivo NIRF-Bildgebung der entnommenen Gehirne und der Gehirnschnitte

Nach der nicht-invasiven Bildgebung wurden die Gehirne der Versuchstiere entfernt und Fluoreszenzaufnahmen der Gehirne angefertigt (siehe Abbildung 10 B und D). Deutlich zu erkennen ist die hohe Fluoreszenzintensität über der ipsilateralen Seite des Gehirns nach Applikation von aktivem Ax5. Jedoch ist ipsilateral auch nach Applikation von inaktivem Ax5 eine im Vergleich zur kontralateralen Seite höhere Fluoreszenzintensität zu verzeichnen. Die geringe, aber messbare Anreicherung von inaktivem Ax5 im Schlaganfall weist auf eine unspezifische Aufnahme von Ax5 aufgrund einer Störung der Blut-Hirn-Schranke im ischämischen Gewebe hin. Das inaktive Ax5 Signal ist jedoch so gering, dass es nicht-invasiv nicht messbar war. Dennoch wird mit der Kontrolle deutlich, dass nach Applikation von aktivem Ax5 ein Teil des Signals im Schlaganfallgewebe durch unspezifische Anreicherung aufgrund der Schrankenstörung zurückgeht.

Von einem Teil der Gehirne wurden 1 mm dicke Schnitte angefertigt und die Fluoreszenzverteilung in den Schnitten bestimmt. Danach wurden die Schnitte mit TTC behandelt. Wie die Abbildung 12 zeigt, ist auch hier eine hohe Fluoreszenzintensität über der ipsilateralen Seite des Gehirns nach Applikation von aktivem Ax5

nachweisbar, jedoch ebenso eine geringe, aber messbare Anreicherung nach Applikation von inaktivem Ax5. In beiden Fällen stimmen die Bereiche erhöhter Fluoreszenzintensität mit den Bereichen, die sich mit der TTC-Färbung deutlich schwächer färben und damit dem Schlaganfallbereich sehr gut überein. Es bleibt festzuhalten, dass mit fluoreszenzmarkiertem, aktivem Ax5 eine gute Abgrenzung des Schlaganfallbereichs möglich ist und eine nur schwache Fluoreszenz im Bereich des nicht-ischämischen Gehirnparenchyms, aufgrund von verbleibendem Ax5 in der Zirkulation, zu verzeichnen ist.

4.3 Histologie

Nach Applikation von inaktivem Cy5.5-Ax5 ist außer im Bereich von großen Gefäßen im Parenchym keine Fluoreszenz nachweisbar. Dies gilt für ischämisches als auch für nicht-ischämisches Gewebe. Im Gegensatz dazu ist nach Injektion von aktivem Cy5.5-Ax5 neben Signalen von großen Gefäßen Fluoreszenz im Parenchym des ischämischen Gewebes detektierbar (siehe Abbildung 13). Der Vergleich mit der Aufnahme von PI und der TUNEL-Färbung zeigt, dass Ax5 einen großen Anteil (etwa 75 %), nicht aber den gesamten Anteil der geschädigten Zellen markiert. Etwa 25 % der PI- und/oder TUNEL-positiven Zellen waren Ax5-negativ (siehe Abbildung 14). Vergegenwärtigt man sich die zellbiologischen Abläufe beim Sterben von Zellen, müssten zumindest die TUNEL-positiven Zellen auch immer Ax5-positiv sein, da mit der TUNEL-Färbung DNA-Fragmente detektiert werden, die erst in der Endphase des Zellsterbens auftreten, wohingegen PS sehr früh exponiert wird. Der Befund TUNEL-positiver aber Ax5-negativer lässt sich damit erklären, dass diese Zellen zwar PS exponieren, jedoch das systemisch injizierte Ax5 diese Zellen nicht erreicht hat. Insgesamt zeigen die Daten jedoch, dass Ax5 mit hoher Spezifität an geschädigte Zellen bindet und histologisch eine gute Übereinstimmung mit den beiden anderen Schadensmarkern zeigt.

Die Arbeit von Unal-Cevik et al. vergleicht die Verteilung von intraventrikulär appliziertem PI mit TUNEL- und Caspase-3-Färbung im Schlaganfall-Tiermodell (30 min Ischämiezeit) [Unal-Cevik et al., 2004]. Ax5 wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Den Versuchstieren wurde 6 und 72 Stunden nach Ischämie PI in den rechten lateralen Ventrikel injiziert. Gegenüber dem frühen Zeitpunkt war nach 72 Stunden ein deutlicher

Anstieg PI-, TUNEL- und Caspase-3-positiver Zellen zu erkennen. Besonders in Bereichen mit großem Schaden war ein Großteil der Zellen PI- und TUNEL-positiv. PI-positive Zellen waren zum überwiegenden Teil auch Caspase-3 positiv unabhängig von der Region. Welche Zelltypen Ax5 binden, wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Dazu wäre zusätzlich eine immunhistochemische Färbung der Zellen notwendig gewesen. In der von Tang et al. publizierten Arbeit wurde durch Inkubation von Gehirnschnitten mit fluoreszenzmarkiertem Ax5 und Immunhistochemie eine Bindung von Ax5 nach einem und drei Tagen nach Ischämie an Neuronen und zu späten Zeitpunkten (nach 7 und 30 Tagen) an Mikrogliazellen demonstriert [Tang et al., 2007].

Die Abbildung 14 zeigt nach Applikation von Cy5.5-Ax5 eine hohe Fluoreszenzintensität in den Ependymzellen der ipsi- und kontralateralen Ventrikel. Dies war auch nach Applikation von inaktivem Cy5.5-Ax5 der Fall. Auch das injizierte PI zeigt eine starke Anreicherung in diesen Zellen, wohingegen im Ependym nur eine sehr geringe Anzahl TUNEL-positiver Zellen nachweisbar waren. Dies spricht für eine unspezifische, nicht mit toten Zellen assoziierte Bindung bzw. Aufnahme von Ax5 und PI in bzw. durch Ependymzellen. Über die Gründe hierfür lässt sich nur spekulieren. Sicher ist nur, dass das Ependym über keine Blut-Hirn-Schranke verfügt und sehr stoffwechselaktiv ist. Was die ventrikuläre Aufnahme von PI betrifft, wird dies in der Arbeit von Unal-Cevik et al. nicht erwähnt [Unal-Cevik et al., 2004], jedoch wurde die Aufnahme von PI ins Ependym in einer Arbeit von Hussain et al. ebenfalls beschrieben. Diese Arbeit zeigt, dass intravenös appliziertes PI bei gesunden Mäusen die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, jedoch in den Ependymzellen vorzufinden war [Hussain et al., 1985]. Was die ventrikuläre Bindung von Ax5 betrifft, so wird dies im Schlaganfall-Tiermodell nur in der Arbeit von Mari et al. erwähnt [Mari et al., 2004], nicht jedoch in der Arbeit von Tang et al. [Tang et al., 2007]. In beiden klinischen Arbeiten wird keine ventrikuläre Aufnahme von Ax5 beschrieben [Blankenberg et al., 2006; Lorberboym et al., 2006].

Die Aufnahme von Ax5 in die Ventrikel beider Gehirn-Hemisphären ist sicherlich ein Grund für die im Vergleich zu anderen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit anderen molekularen Markern relativ niedrigen TBRs. Erstaunlicher Weise führen weder ein mit Cy5.5 markierter Antikörper spezifisch für den proinflammatorischen CD40 Rezeptor, noch eine durch Matrixmetalloproteinasen spaltbare Fluoreszenzprobe

bei intravenöser Injektion zu messbaren Signalen in den Ventrikeln und damit zu einem Hintergrundsignal [Klohs et al., 2009; Klohs et al., 2008b]. Die Aufnahme von Ax5 in die Ventrikel stellt allerdings nur für ein wie in dieser Arbeit eingesetztes planares System ein Problem dar. Beim Einsatz von tomographischen Systemen ist dieses Hintergrundsignal kein Problem, da ein Signal in den Ventrikeln nicht in die Auswertung der Bilddaten einbezogen werden muss.

4.4 Klinische Perspektive

Es sind zwei klinische Studien publiziert bei denen Schlaganfall-Patienten radioaktiv markiertes Ax5 injiziert wurde und die Patienten anschließend mit SPECT untersucht wurden. In der Arbeit von Blankenberg et al. sind insgesamt nur zwei Patienten beschrieben, die im Zeitraum 24 - 72 Stunden und einen Monat nach Schlaganfall untersucht wurden. Die SPECT-Bildgebung erfolgte ein und zwei Stunden nach Applikation des Tracers. Es wurden zusätzlich diffusionsgewichtete MRT-Aufnahmen durchgeführt. Bei beiden Patienten konnte eine multifokale Aktivitätsaufnahme im Bereich des Schlaganfalls zu den frühen Zeitpunkten nach Ischämie detektiert werden [Blankenberg et al., 2006]. Die Studie von Lorberboym et al. schloss insgesamt zwölf Patienten, ebenfalls mit akutem Schlaganfall, ein. Die SPECT-Bildgebung erfolgte hier zwei Stunden nach Applikation des Tracers. Alle Patienten wurden mit CT untersucht. Bei sieben Patienten wurde zusätzlich die Störung der Blut-Hirn-Schranke mit ^{99m}Tc -DTPA und SPECT untersucht. Bei acht der zwölf Patienten konnte im Schlaganfallbereich eine multifokale Anreicherung des Tracers festgestellt werden, wobei bei allen sieben Patienten die mit ^{99m}Tc -DTPA und SPECT untersucht wurden, auch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke nachweisbar war [Lorberboym et al., 2006].

Diese klinischen Studien zeigen, dass radioaktiv markiertes Ax5 potentiell am Patienten zur Visualisierung von geschädigtem Gewebe einsetzbar ist. Allerdings bedarf es weiterer klinischer Studien mit mehr Patienten, um den Nutzen der Methode in der Diagnostik und Therapie von Schlaganfallpatienten nachzuweisen. Ein Nachteil nuklearmedizinischer Untersuchungen gegenüber der MRT und der CT ist mit Sicherheit die geringere Verfügbarkeit und vor allem die relativ geringe Auflösung, die eine genaue anatomische Zuordnung der Signale schwierig macht. Schellenberger et al. koppeln mit der MRT detektierbare Nanopartikel an Ax5 [Schellenberger, 2008].

Vielleicht wird es in Zukunft möglich sein, die Anreicherung von Ax5 im Schlaganfallgewebe mit der MRT bei hoher Auflösung zu detektieren. Ein klinischer Einsatz von fluoreszenzmarkiertem Ax5 erscheint dagegen nach derzeitigem Stand kaum möglich. Zwar können nah-infrarot Fluoreszenzfarbstoffe im Gehirn von Menschen detektiert werden, jedoch nur bis zu einer Tiefe von wenigen Millimetern [Klohs et al., 2008b; Steinbrink et al., 2008].

4.5 Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit konnte die zu Beginn formulierte Hypothese mit dem Erreichen der Ziele bestätigt werden (Kapitel 1.9). Es ist zum ersten Mal gelungen den Zelltod beim ischämischen Schlaganfall der Maus nicht-invasiv durch eine NIRF-Bildgebung nach intravenöser Injektion von fluoreszenzmarkiertem, aktivem Ax5 darzustellen. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass zum ersten Mal inaktives Ax5 als Kontrolle verwendet wurde, um auch unspezifische Anreicherungen von Ax5 zu beschreiben. Dabei hat sich gezeigt, dass nach Applikation von aktivem Ax5 ein Teil des Signals auf die Störung der Blut-Hirn-Schranke zurückgeht. Die histologischen Untersuchungen dieser Arbeit sprechen für eine hohe Spezifität von Ax5 für geschädigte bzw. tote Zellen, wie der Vergleich mit anderen Schadensmarkern zeigt.

Aus den Daten dieser Arbeit ergeben sich folgende Fragen, die in künftigen Studien untersucht werden müssen: Zurzeit liegen keine quantitativen Daten der Aufnahme von Ax5 ins Schlaganfallgewebe vor und es kann nur grob abgeschätzt werden wie hoch der unspezifische Anteil des Ax5-Signals im Schlaganfallgewebe ist. Hierzu muss aktives und inaktives Ax5 mit zwei unterschiedlichen, signalgebenden Molekülen markiert werden und deren Verteilung im gleichen Versuchstier erfasst werden. Da derzeit mit fluoreszenzoptischen Methoden eine Quantifizierung und eine eindeutige Trennung von zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen in NIRF-Bereich sehr schwierig ist, müssen andere Verfahren eingesetzt werden. Hierzu eignen sich nuklearmedizinische Verfahren, die es erlauben verschiedene SPECT-Radioisotope spektral eindeutig zu trennen und quantitative Daten zu erheben. Die Ergebnisse sollten parallel mit dem DWI/PWI-mismatch in der MRT verglichen werden. Wichtig ist auch eine genauere Untersuchung von mit Nanopartikeln markiertem Ax5 mit der MRT. Diese Untersuchungen am MCAO-Tiermodell sind in der Planung.

Zusammenfassung

Der thrombotische oder thromboembolische Verschluss eines gehirnversorgenden Gefäßes führt zu einer kritischen Reduktion des zerebralen Blutflusses und somit konsekutiv zum ischämischen Schlaganfall. Direkte Schäden und komplexe Schadenskaskaden führen zum Absterben von Zellen zunächst im Schlaganfallkern und folgend in der Penumbra ("tissue at risk"). Geeignete Therapiemaßnahmen (z. B. Thrombolyse) können eine Ausdehnung des Schadens vom Schlaganfallkern in die Penumbra hinein aufhalten. Mit dem "PWI/DWI-mismatch" der MRT lässt sich die Penumbra derzeit nur mit unzureichender Genauigkeit erfassen. Ein spezifischer Marker zur nicht-invasiven Detektion von geschädigten bzw. toten Zellen wird noch nicht in der Klinik eingesetzt. Annexin A5 (Ax5) hat eine hohe Affinität für Phosphatidylserine (PS), welche sich bei intakten Zellen überwiegend an der Innenseite der Zellmembran befinden. Bei Nekrose und beim programmierten Zelltod ist PS exponiert und damit durch Ax5 markierbar. Von einer nicht-invasiven molekularen Bildgebung des Zelltodes beim ischämischen Schlaganfall verspricht man sich in Kombination mit CT oder MRT eine genauere Abgrenzung der Penumbra, wodurch mehr Patienten von einer Thrombolyse nach Ablauf des 4,5 Stunden Zeitfensters profitieren könnten als bisher (nur ca. 6 % der Patienten). Zudem kann die Einführung eines spezifischen molekularen Markers für den Gewebeschaden beim ischämischen Schlaganfall einen wichtigen Beitrag zu einem verbesserten Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung leisten.

In dieser Arbeit wurde die Eignung von Ax5 zur nicht-invasiven Detektion geschädigter Zellen beim ischämischen Schlaganfall im Tiermodell überprüft. Hierzu wurde Ax5 mit einem nah-infrarot Fluoreszenz (NIRF) Farbstoff (Cy5.5) markiert und dessen Verteilung im Vergleich zu anderen Schadensmarkern (Propidiumiodid und TUNEL-Färbung) bei Mäusen nach Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO-Modell) untersucht. Cy5.5-Ax5 wurde den Versuchstieren 48 Stunden nach der Okklusion i.v. injiziert. Nach 4 bzw. 8 Stunden Zirkulationszeit wurden nicht-invasive NIRF-Aufnahmen vom Kopf der Mäuse und ex-vivo Aufnahmen vom Gehirn sowie von Gehirnschnitten angefertigt. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen von Ax5 wurde einer Versuchstiergruppe inaktives Cy5.5-Ax5 injiziert, das nicht an PS bindet.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich 4 und 8 Stunden nach Injektion von aktivem, nicht aber nach Injektion von inaktivem Ax5 im MCAO-Modell der Maus mit nicht-invasiver

NIRF-Bildgebung über der ipsilateralen Hemisphäre signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten, als über der kontralateralen Seite nachweisen ließen. Auf den ex-vivo Aufnahmen der Gehirne und der Gehirnschnitte war eine geringe, aber messbare Anreicherung auch von inaktivem Ax5 im Schlaganfallgewebe zu verzeichnen, die auf eine unspezifische Aufnahme von aktivem Ax5 ins ischämische Gewebe aufgrund der Störung der Blut-Hirn-Schranke im Schlaganfallgewebe hinweist. Das inaktive Ax5-Signal war jedoch so gering, dass es nicht-invasiv nicht messbar war. Auch zeigte sich eine hohe unspezifische Anreicherung von Ax5 im venösen System des Gehirns (Confluens sinuum, Sinus sagittalis). Die histologischen Untersuchungen zeigten eine gute Kolo-kalisation von Ax5 mit Propidiumiodid und TUNEL-Färbung, jedoch auch eine offensichtlich unspezifische Bindung von aktivem Ax5 an die Ependymzellen der ipsi- und kontralateralen Ventrikel.

Diese Arbeit zeigt erfolgreich die nicht-invasive Visualisierung von Zelltod beim ischämischen Schlaganfall im Kleintier mit Cy5.5 markiertem Ax5. Eine hohe Spezifität von Ax5 für geschädigte Zellen im Schlaganfallgewebe konnte nachgewiesen werden. Jedoch wurden auch unspezifische Bindungen festgestellt. Klinische Studien an Schlaganfallpatienten mit radioaktiv markiertem Ax5 und SPECT-Bildgebung zeigen, dass Ax5 potentiell am Patienten zur Visualisierung von geschädigtem Gewebe einsetzbar ist. Allerdings bedarf es weiterer klinischer Studien mit mehr Patienten, um den Nutzen der Methode in der Diagnostik und Therapie von Schlaganfallpatienten nachzuweisen.

Literaturverzeichnis

- Bederson, JB; Pitts, LH; Germano, SM; Nishimura, MC; Davis, RL und Bartkowski, HM (1986): Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats, *Stroke* (Band 17), Nr. 6, Seite 1304-1308.
- Blankenberg, F. G. (2008): In vivo detection of apoptosis, *J Nucl Med* (Band 49 Suppl 2), Seite 81S-95S.
- Blankenberg, F. G.; Kalinyak, J.; Liu, L.; Koike, M.; Cheng, D.; Goris, M. L.; Green, A.; Vanderheyden, J. L.; Tong, D. C. und Yenari, M. A. (2006): ^{99m}Tc-HYNIC-annexin V SPECT imaging of acute stroke and its response to neuroprotective therapy with anti-Fas ligand antibody, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (Band 33), Nr. 5, Seite 566-74.
- Boehm, I.; Troeber, F.; Block, W. und Schild, H. (2005): Molekulare Bildgebung von Apoptose und Nekrose - Zellbiologische Grundlagen und Einsatz in der Onkologie, *Molecular Imaging of Apoptosis and Necrosis - Basic Principles of Cell Biology and Use in Oncology*, Nr. 03, Seite 263-271.
- Boersma, H. H.; Kietselaer, B. L.; Stolk, L. M.; Bennaghmouch, A.; Hofstra, L.; Narula, J.; Heidendal, G. A. und Reutelingsperger, C. P. (2005): Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications, *J Nucl Med* (Band 46), Nr. 12, Seite 2035-50.
- Bourayou, R.; Boeth, H.; Benav, H.; Betz, T.; Lindauer, U.; Nierhaus, T.; Klohs, J.; Wunder, A.; Dirnagl, U. und Steinbrink, J. (2008): Fluorescence tomography technique optimized for noninvasive imaging of the mouse brain, *J Biomed Opt* (Band 13), Nr. 4, Seite 041311.
- Bremer, C.; Ntziachristos, V. und Weissleder, R. (2003): Optical-based molecular imaging: contrast agents and potential medical applications, *Eur Radiol* (Band 13), Nr. 2, Seite 231-43.
- Bremer, Christoph; Bredow, Sebastian; Mahmood, Umar; Weissleder, Ralph und Tung, Ching-Hsuan (2001): Optical Imaging of Matrix Metalloproteinase-2 Activity in Tumors: Feasibility Study in a Mouse Model, *Radiology* (Band 221), Nr. 2, Seite 523-529.
- California Acute Stroke Pilot Registry Investigators (2005): Prioritizing interventions to improve rates of thrombolysis for ischemic stroke, *Neurology* (Band 64), Nr. 4, Seite 654-659.
- Davis, Stephen M. und Donnan, Geoffrey A. (2009): MR Mismatch and Thrombolysis: Appealing but Validation Required, *Stroke* (Band 40), Nr. 8, Seite 2910-.
- Denecker, G.; Vercammen, D.; Declercq, W. und Vandenabeele, P. (2001): Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors, *Cell Mol Life Sci* (Band 58), Nr. 3, Seite 356-70.
- Dirnagl, U.; Iadecola, C. und Moskowitz, M. A. (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view, *Trends Neurosci* (Band 22), Nr. 9, Seite 391-7.
- Donnan, Geoffrey A.; Fisher, Marc; Macleod, Malcolm und Davis, Stephen M. (2008): Stroke, *The Lancet* (Band 371), Nr. 9624, Seite 1612-1623.
- Ebinger, M.; De Silva, D. A.; Christensen, S.; Parsons, M. W.; Markus, R.; Donnan, G. A. und Davis, S. M. (2009): Imaging the penumbra - strategies to detect tissue at risk after ischemic stroke, *J Clin Neurosci* (Band 16), Nr. 2, Seite 178-87.

- Fadok, V. A.; Voelker, D. R.; Campbell, P. A.; Cohen, J. J.; Bratton, D. L. und Henson, P. M. (1992): Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *J Immunol* (Band 148), Nr. 7, Seite 2207-2216.
- Fisher, M. (2004): The ischemic penumbra: identification, evolution and treatment concepts, *Cerebrovasc Dis* (Band 17 Suppl 1), Seite 1-6.
- Gavrieli, Y; Sherman, Y und Ben-Sasson, SA (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J. Cell Biol.* (Band 119), Nr. 3, Seite 493-501.
- Grimm, J. und Wunder, A. (2005): [Current state of molecular imaging research], *Rofo* (Band 177), Nr. 3, Seite 326-37.
- Haas, Rick L. M.; de Jong, Daphne; ValdÈs Olmos, Renato A.; Hoefnagel, Cees A.; van Den Heuvel, Iris; Zerp, Shuraila F.; Bartelink, Harry und Verheij, Marcel (2004): In vivo imaging of radiation-induced apoptosis in follicular lymphoma patients, *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* (Band 59), Nr. 3, Seite 782-787.
- Harraz, Maged M.; Dawson, Ted M. und Dawson, Valina L. (2008): Advances in Neuronal Cell Death 2007, *Stroke* (Band 39), Nr. 2, Seite 286-288.
- Heiss, W. D. und Sobesky, J. (2008): Comparison of PET and DW/PW-MRI in acute ischemic stroke, *Keio J Med* (Band 57), Nr. 3, Seite 125-31.
- Hussain, S. T.; Attilo, A.; Bigotte, L.; Cesarini, K. und Olsson, Y. (1985): Cytofluorescence localization of propidium iodide injected intravenously into the nervous system of the mouse, *Acta Neuropathol* (Band 66), Nr. 1, Seite 62-7.
- Jaffer, Farouc A. und Weissleder, Ralph (2005): Molecular Imaging in the Clinical Arena, *JAMA* (Band 293), Nr. 7, Seite 855-862.
- Kashefi, A.; Zhao, H. und Chen, X. (2008): Molecular imaging as the main part of our decision-making and treatment strategies in stroke, *Front Biosci* (Band 13), Seite 1535-56.
- Kietselaer, B. L.; Hofstra, L.; Dumont, E. A.; Reutelingsperger, C. P. und Heidendal, G. A. (2003): The role of labeled Annexin A5 in imaging of programmed cell death. From animal to clinical imaging, *Q J Nucl Med* (Band 47), Nr. 4, Seite 349-61.
- Kietselaer, B. L.; Reutelingsperger, C. P.; Heidendal, G. A.; Daemen, M. J.; Mess, W. H.; Hofstra, L. und Narula, J. (2004): Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis, *N Engl J Med* (Band 350), Nr. 14, Seite 1472-3.
- Klohs, J.; Baeva, N.; Steinbrink, J.; Bourayou, R.; Boettcher, C.; Roysl, G.; Megow, D.; Dirnagl, U.; Priller, J. und Wunder, A. (2009): In vivo near-infrared fluorescence imaging of matrix metalloproteinase activity after cerebral ischemia, *J Cereb Blood Flow Metab* (Band 29), Nr. 7, Seite 1284-92.
- Klohs, J.; Steinbrink, J.; Nierhaus, T.; Bourayou, R.; Lindauer, U.; Bahmani, P.; Dirnagl, U. und Wunder, A. (2006): Noninvasive near-infrared imaging of fluorochromes within the brain of live mice: an in vivo phantom study, *Mol Imaging* (Band 5), Nr. 3, Seite 180-7.
- Klohs, J.; Wunder, A. und Licha, K. (2008a): Near-infrared fluorescent probes for imaging vascular pathophysiology, *Basic Res Cardiol* (Band 103), Nr. 2, Seite 144-51.
- Klohs, Jan; Grafe, Michael; Graf, Kristof; Steinbrink, Jens; Dietrich, Thore; Stibenz, Dietger; Bahmani, Peyman; Kronenberg, Golo; Harms, Christoph; Endres, Matthias; Lindauer, Ute; Greger, Klaus; Stelzer, Ernst H.K.; Dirnagl, Ulrich und Wunder, Andreas (2008b): In Vivo Imaging of the Inflammatory Receptor CD40

- After Cerebral Ischemia Using a Fluorescent Antibody, *Stroke* (Band 39), Nr. 10, Seite 2845-2852.
- Klohs, Jan; Steinbrink, Jens; Bourayou, Riad; Mueller, Susanne; Cordell, Ryan; Licha, Kai; Schirner, Michael; Dirnagl, Ulrich; Lindauer, Ute und Wunder, Andreas (2009a): Near-infrared fluorescence imaging with fluorescently labeled albumin: A novel method for non-invasive optical imaging of blood-brain barrier impairment after focal cerebral ischemia in mice, *Journal of Neuroscience Methods* (Band 180), Nr. 1, Seite 126-132.
- Kolominsky-Rabas, Peter L.; Heuschmann, Peter U.; Marschall, Daniela; Emmert, Martin; Baltzer, Nikoline; Neundorfer, Bernhard; Schoffski, Oliver; Krobot, Karl J. und for the CompetenceNet Stroke (2006): Lifetime Cost of Ischemic Stroke in Germany: Results and National Projections From a Population-Based Stroke Registry: The Erlangen Stroke Project, *Stroke* (Band 37), Nr. 5, Seite 1179-1183.
- Lorberboym, M.; Blankenberg, F. G.; Sadeh, M. und Lampl, Y. (2006): In vivo imaging of apoptosis in patients with acute stroke: correlation with blood-brain barrier permeability, *Brain Res* (Band 1103), Nr. 1, Seite 13-9.
- Mari, C.; Karabiyikoglu, M.; Goris, M. L.; Tait, J. F.; Yenari, M. A. und Blankenberg, F. G. (2004): Detection of focal hypoxic-ischemic injury and neuronal stress in a rodent model of unilateral MCA occlusion/reperfusion using radiolabeled annexin V, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (Band 31), Nr. 5, Seite 733-9.
- Massoud, Tarik F. und Gambhir, Sanjiv S. (2003): Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light, *Genes Dev.* (Band 17), Nr. 5, Seite 545-580.
- Maulaz, A.; Piechowski-Jûzwiak, B.; Michel, P. und Bogousslavsky, J. (2005): Selecting Patients for Early Stroke Treatment with Penumbra Images, *Cerebrovascular Diseases* (Band 20), Nr. Suppl. 2, Seite 19-24.
- Meairs, S.; Wahlgren, N.; Dirnagl, U.; Lindvall, O.; Rothwell, P.; Baron, J. C.; Hossmann, K.; Engelhardt, B.; Ferro, J.; McCulloch, J.; Kaste, M.; Endres, M.; Koistinaho, J.; Planas, A.; Vivien, D.; Dijkhuizen, R.; Czlonkowska, A.; Hagen, A.; Evans, A.; De Libero, G.; Nagy, Z.; Rastenyte, D.; Reess, J.; Davalos, A.; Lenzi, G. L.; Amarenco, P. und Hennerici, M. (2006): Stroke research priorities for the next decade--A representative view of the European scientific community, *Cerebrovasc Dis* (Band 22), Nr. 2-3, Seite 75-82.
- Ntziachristos, V. (2006): Fluorescence molecular imaging, *Annu Rev Biomed Eng* (Band 8), Seite 1-33.
- Ntziachristos, V.; Bremer, C. und Weissleder, R. (2003): Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging, *Eur Radiol* (Band 13), Nr. 1, Seite 195-208.
- Ntziachristos, V.; Ripoll, J.; Wang, L. V. und Weissleder, R. (2005): Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging, *Nat Biotechnol* (Band 23), Nr. 3, Seite 313-20.
- Paciaroni, M.; Caso, V. und Agnelli, G. (2009): The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities, *Eur Neurol* (Band 61), Nr. 6, Seite 321-30.
- Phan, T. G.; Wright, P. M.; Markus, R.; Howells, D. W.; Davis, S. M. und Donnan, G. A. (2002): Salvaging the ischaemic penumbra: more than just reperfusion?, *Clin Exp Pharmacol Physiol* (Band 29), Nr. 1-2, Seite 1-10.
- Prinz, Vincent; Laufs, Ulrich; Gertz, Karen; Kronenberg, Golo; Balkaya, Mustafa; Leithner, Christoph; Lindauer, Ute und Endres, Matthias (2008): Intravenous

- Rosuvastatin for Acute Stroke Treatment: An Animal Study, *Stroke* (Band 39), Nr. 2, Seite 433-438.
- Schellenberger, E. A.; Weissleder, R. und Josephson, L. (2004): Optimal modification of annexin V with fluorescent dyes, *Chembiochem* (Band 5), Nr. 3, Seite 271-4.
- Schellenberger, Jörg Schnorr, Chris Reutelingsperger, Liset Ungeth, m, Wolfdietrich Meyer, Matthias Taupitz, Bernd Hamm, (2008): Linking Proteins with Anionic Nanoparticles via Protamine: Ultrasmall Protein-Coupled Probes for Magnetic Resonance Imaging of Apoptosis, *Small* (Band 4), Nr. 2, Seite 225-230.
- Shaida A. Andrabi, Ted M. Dawson, Valina L. Dawson, (2008): Mitochondrial and Nuclear Cross Talk in Cell Death, *Annals of the New York Academy of Sciences* (Band 1147), Nr. Mitochondria and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders, Seite 233-241.
- Sobesky, J. (2009): [Therapy of acute ischemic stroke.], *Internist* (Berl).
- Sosnovik, D. E.; Schellenberger, E. A.; Nahrendorf, M.; Novikov, M. S.; Matsui, T.; Dai, G.; Reynolds, F.; Grazette, L.; Rosenzweig, A.; Weissleder, R. und Josephson, L. (2005): Magnetic resonance imaging of cardiomyocyte apoptosis with a novel magneto-optical nanoparticle, *Magn Reson Med* (Band 54), Nr. 3, Seite 718-24.
- Steinbrink, J.; Liebert, A.; Wabnitz, H.; Macdonald, R.; Obrig, H.; Wunder, A.; Bourayou, R.; Betz, T.; Klohs, J.; Lindauer, U.; Dirnagl, U. und Villringer, A. (2008): Towards Noninvasive Molecular Fluorescence Imaging of the Human Brain, *Neurodegenerative Diseases* (Band 5), Nr. 5, Seite 296-303.
- Tang, Xian Nan; Wang, Qing; Koike, Maya A.; Cheng, Danye; Goris, Michael L.; Blankenberg, Francis G. und Yenari, Midori A. (2007): Monitoring the Protective Effects of Minocycline Treatment with Radiolabeled Annexin V in an Experimental Model of Focal Cerebral Ischemia, *J Nucl Med* (Band 48), Nr. 11, Seite 1822-1828.
- The European Registers of Stroke Investigators (2009): Incidence of Stroke in Europe at the Beginning of the 21st Century, *Stroke* (Band 40), Nr. 5, Seite 1557-1563.
- Thimister, Paul W.L.; Hofstra, Leo; Liem, Ing Han; Boersma, Hendrikus H.; Kemerink, Gerrit; Reutelingsperger, Chris P.M. und Heidendal, Guido A.K. (2003): In Vivo Detection of Cell Death in the Area at Risk in Acute Myocardial Infarction, *J Nucl Med* (Band 44), Nr. 3, Seite 391-396.
- Unal-Cevik, I., Kilinc, M., Can, A., Gursoy-Ozdemir, Y., Dalkara, T. (2004): Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia, *Stroke* (Band 35), Nr. 9, Seite 2189-94
- Unal Cevik, I. und Dalkara, T. (2003): Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury, *Cell Death Differ* (Band 10), Nr. 8, Seite 928-9.
- Vanden Berghe, Tom; Declercq, Wim und Vandenabeele, Peter (2007): NADPH Oxidases: New Players in TNF-Induced Necrotic Cell Death, *Molecular Cell* (Band 26), Nr. 6, Seite 769-771.
- Weissleder, R. (2002): Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice, *Nat Rev Cancer* (Band 2), Nr. 1, Seite 11-8.
- Weissleder, Ralph und Mahmood, Umar (2001): Molecular Imaging, *Radiology* (Band 219), Nr. 2, Seite 316-333.
- Weissleder, Ralph und Ntziachristos, Vasilis (2003): Shedding light onto live molecular targets, *Nat Med* (Band 9), Nr. 1, Seite 123-128.
- Wunder, A. und Klohs, J. (2008a): Optical imaging of vascular pathophysiology, *Basic Res Cardiol* (Band 103), Nr. 2, Seite 182-90.

- Wunder, A.; Schellenberger, E.; Mahmood, U.; Bogdanov, A., Jr.; Muller-Ladner, U.; Weissleder, R. und Josephson, L. (2005): Methotrexate-induced accumulation of fluorescent annexin V in collagen-induced arthritis, *Mol Imaging* (Band 4), Nr. 1, Seite 1-6.
- Zwaal, R. F.; Comfurius, P. und Bevers, E. M. (2005): Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells, *Cell Mol Life Sci* (Band 62), Nr. 9, Seite 971-88.

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Ax5	Annexin A5
ATP	Adenosin-Triphosphat
CCD	Charged coupled device
CT	Computertomographie
DI	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DWI	Diffusion-weighted imaging
dUTP	Digoxigein-konjugierte Desoxyuridin
FITC	Fluorescein
FMT	Fluorescence Mediated Tomography
FRI	Fluorescence Reflectance Imaging
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.v.	intravenös
i.p.	intraperitoneal
MCAO	middle cerebral artery occlusion
MRT	Magnetresonanztomographie
NIRF	Near-infrared fluorescence
PS	Phosphatidylserine
PI	Propidiumiodid
PWI	Perfusion-weighted imaging
ROI	Region of interest
rt-PA	recombinant tissue plasminogen activator
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography

TBR	target-to-background-ratio
TdT	Desoxynukleotidyl-Transferase
TIF	tagged image file
TTC	Triphenyltetrazolium Chloride Färbung
TUNEL	TdT-mediated dUTP-Biotin-nick end labeling

Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Andreas Wunder für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete persönliche Betreuung über den gesamten Zeitraum der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Dirnagl möchte ich für die Unterstützung dieser Arbeit danken. Vor allem die konstruktiven Diskussionen und die kritischen Fragen bereicherten meine Arbeit an diesem Thema.

Herrn Prof. Dr. Schellenberger danke ich für die Herstellung der aktiven und inaktiven Cy5.5-Ax5 Proben.

Ich danke Dr. Jan Klohs für die Einarbeitung in die praktischen Fähigkeiten, sowie für sein stetes persönliches Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt den Physikern Dr. Jens Steinbrink und Dr. Riad Bourayou für die Konstruktion des eingesetzten NIRF-Bildgebungssystems, für die kooperative Zusammenarbeit, sowie die tatkräftige und persönliche Unterstützung meiner Arbeit.

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

Publikationen

Klohs, J.; Steinbrink, J.; Nierhaus, T.; Bourayou, R.; Lindauer, U.; Bahmani, P.; Dirnagl, U. und Wunder, A. (2006): Noninvasive near-infrared imaging of fluorochromes within the brain of live mice: an in vivo phantom study, Mol Imaging (Band 5), Nr. 3, Seite 180-7.

Klohs, J.; Grafe, M.; Graf, K.; Steinbrink, J.; Dietrich, T.; Stibenz, D.; Bahmani, P.; Kronenberg, G.; Harms, C.; Endres, M.; Lindauer, U.; Greger, K.; Stelzer, E.; Dirnagl, U. und Wunder, A. (2008): In Vivo Imaging of the Inflammatory Receptor CD40 After Cerebral Ischemia Using a Fluorescent Antibody, Stroke (Band 39), Nr. 10, Seite 2845-2852.

Erklärung

„Ich, Peyman Bahmani, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Visualisierung des Zelltodes im Schlaganfallmodell der Maus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift