

Aus dem  
CharitéCentrum 15 für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie  
Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Endres

## Habilitationsschrift

Phagozytosehemmung, frühe normobare Oxygenierung und maschinelles Lernen – neue  
Ansätze für Therapie und Refinement in der tierexperimentellen Schlaganfallforschung

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Julius Valentin Emmrich

Eingereicht im März 2021

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Herr Professor Dr. med. Tim Magnus
2. Gutachter: Herr Professor Dr. med. Roland Veltkamp

# INHALTSVERZEICHNIS

|  |           |
|--|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....   | 1         |
| <b>1. EINLEITUNG.....</b>  | <b>2</b>  |
| 1.1. Ausgangslage und Motivation.....  | 2         |
| 1.2. Pathophysiologie der zerebralen Ischämie.....   | 4         |
| 1.2.1. Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen.....   | 6         |
| 1.3. “Lost in translation” – Qualitätsmängel in der tierexperimentellen Forschung<br>als Herausforderung für eine erfolgreiche Translation in die klinische Anwendung....  | 8         |
| 1.3.1. Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen.....   | 10        |
| 1.4. Zielsetzung und wissenschaftliche Fragestellungen.....  | 12        |
| <b>2. EIGENE ARBEITEN.....</b>   | <b>13</b> |
| 2.1. Phagozytose verursacht neuronalen Zelltod nach fokaler Hirnischämie.....  | 13        |
| 2.2. Vergleich von automatisierten quantitativen versus semiquantitativen immunhisto-<br>chemischen Auswertungsmethoden zur Beurteilung von selektivem neuronalem<br>Zellverlust und Mikrogliaaktivierung nach transienter fokaler Hirnischämie..... | 24        |
| 2.3. Normobare Oxygenierung reduziert Hirnschäden und sensomotorische Defizite<br>nach kurzzeitiger fokaler Hirnischämie.....  | 33        |
| 2.4. Vorhersage von Abbruchkriterien in tierexperimentellen Mausmodellen durch<br>maschinelles Lernen.....   | 49        |
| 2.5. Körpertemperatur als Abbruchkriterium in tierexperimentellen Mausmodellen:<br>Implantierbarer Temperaturtransponder versus Infrarotmessung.....   | 68        |
| <b>3. DISKUSSION.....</b>  | <b>79</b> |
| <b>4. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>   | <b>88</b> |
| <b>5. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>  | <b>89</b> |
| <b>6. DANKSAGUNG.....</b>  | <b>96</b> |
| <b>7. ERKLÄRUNG nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité .....</b>  | <b>97</b> |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|         |  |
|---------|--|
| ARRIVE  | Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments                  |
| ATP     | Adenosintriphosphat  |
| DAMPs   | Damage-associated molecular pattern molecules                      |
| GCSP    | Gold Standard Publication Checklist                                |
| IMPROVE | Ischaemia Models: Procedural Refinements Of in Vivo Experiments    |
| MA      | Microglial activation (aktivierte Mikroglia)                       |
| MCAo    | Middle cerebral artery occlusion (Verschluss der A. cerebri media) |
| MerTK   | Mer receptor tyrosine kinase                                       |
| MFG-E8  | Milk fat globule EGF-like factor 8                                 |
| ML      | Machine learning (maschinelles Lernen)                             |
| MRT     | Magnetresonanztomographie  |
| NBO     | Normobaric oxygenation (normobare Oxygenierung)                    |
| PS      | Phosphatidylserin  |
| ROIs    | Regions of interest (Untersuchungsbereich)                         |
| SNL     | Selective neuronal loss (selektiver neuronaler Zellverlust)        |
| TIA     | Transitorische ischämische Attacke                                 |

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Ausgangslage und Motivation

Der Schlaganfall ist eine der häufigsten Ursachen für eine bleibende Behinderung und die zweithäufigste Todesursache (nach Herzerkrankungen) mit jährlich etwa 6 Millionen Todesfällen, von denen ca. 70 % in Entwicklungsländern auftreten<sup>1,2</sup>. Während der vergangenen dreißig Jahre haben Fortschritte bei der Bildgebung und klinischen Akutbehandlung dazu beigetragen, die Schlaganfallmortalität weltweit zu reduzieren<sup>2</sup>. Da die Weltbevölkerung aber wächst und altert, ist die Schlaganfallprävalenz gemessen an der absoluten Zahl der von einem Schlaganfall betroffenen oder behinderten Menschen hoch und nimmt stetig zu<sup>2</sup>. Weltweit sind etwa 7 von 10 Schlaganfällen ischämische Schlaganfälle (d. h. durch eine Minderdurchblutung des Hirngewebes verursacht). Seltener (ca. 30 %) werden Schlaganfälle durch eine Hirnblutung verursacht<sup>3</sup>. Allerdings erhalten weniger als 15 % der Patienten in Deutschland und weniger als 1 % der Patienten in Entwicklungsländern im Falle eines ischämischen Schlaganfalls eine wirksame, d. h. das verschlossene Gefäß eröffnende Thrombolyse<sup>4,5</sup>, was vor allem auf das zeitlich enge Behandlungsfenster und fehlende Ressourcen im Gesundheitssystem zurückzuführen ist<sup>4-6</sup>. Darüber hinaus bleibt bei der Mehrheit der Patienten auch nach der Therapie eine relevante funktionelle Beeinträchtigung zurück<sup>7</sup>. Offensichtlich besteht ein großer Bedarf an neuen wirksamen und möglichst kostengünstigen Behandlungsstrategien, um das Überleben und das funktionelle Outcome von Schlaganfallpatienten weltweit zu verbessern.

In den vergangenen Jahrzehnten hat die tierexperimentelle Grundlagenforschung unser Verständnis der molekularen und zellulären pathophysiologischen Mechanismen des ischämischen Schlaganfalls wesentlich bereichert; zahlreiche neue Therapieansätze wurden identifiziert (für Übersichtsarbeiten siehe<sup>8-10</sup>). Dennoch sind die intravenöse Thrombolyse und die interventionelle Thrombektomie bislang die einzigen wirksamen akuten Behandlungsmethoden für menschliche Schlaganfallpatienten<sup>11</sup>. Trotz vielfacher Anstrengungen sind Studien, die darauf abzielten, Erkenntnisse der tierexperimentellen Grundlagenforschung in klinisch erfolgreiche Behandlungsstrategien zu übertragen, weitestgehend gescheitert<sup>12,13</sup>. Eine gängige Auffassung der modernen Schlaganfallforschung ist, dass "alles im Tierversuch funktioniert, aber nichts im Menschen"<sup>13</sup>. Die Gründe für die

fehlgeschlagene Translation vom Tier zum Mensch sind vielfältig, wobei Qualitätsmängel in der tierexperimentellen Forschung, wie beispielsweise fehlende Randomisierung und Verblindung zur Vermeidung von Stichprobenverzerrung, eine der Hauptursachen sind<sup>14-16</sup>. Andere Gründe umfassen u.a. die mangelnde Eignung von Tiermodellen zur Nachbildung menschlicher Krankheitszustände und Mängel im klinischen Studiendesign<sup>13,15,17</sup>. Dadurch entsteht auch ein ethisches Dilemma, denn klinische Studien, welche auf fehlerhaften präklinischen Daten beruhen laufen ebenso Gefahr unethisch zu sein wie die Verwendung von Tieren für Versuche, deren Aussagekraft aufgrund qualitativer Mängel unzureichend ist<sup>18</sup>. Um die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Translation neuer Therapieansätze in die klinische Anwendung zu erhöhen, besteht eine große Notwendigkeit, die Qualität der tierexperimentellen Forschung zu verbessern.

## 1.2. Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Das Gehirn ist das sauerstoffempfindlichste Organ des Körpers<sup>19</sup>. Sauerstoff wird fast ausschließlich für den oxidativen Stoffwechsel von Glukose verwendet, welche der wichtigste Energielieferant des Gehirns ist<sup>20</sup>. Ein vorübergehender oder permanenter embolischer (durch eingeschwemmtes Gerinnsel) oder thrombotischer (durch lokal gebildetes Gerinnsel) Verschluss einer hirnersorgenden Arterie oder eine hämodynamische Ursache (Hypotonie) verursachen eine Minderversorgung des Gehirns mit Sauerstoff und Glukose. Das Überleben des minderperfundierte Gewebes ist abhängig von der Dauer der Durchblutungsstörung, dem Ausmaß der Flussreduktion und dem Vorhandensein von Kollateralkreisläufen<sup>19</sup>. Führt die Minderdurchblutung zum Absterben von Nerven- und anderer Hirnzellen spricht man von einem ischämischen Schlaganfall. Wird die Durchblutung rasch wiederhergestellt, ist die Funktionsstörung des Gehirns nur vorübergehend und ein Gewebsuntergang bleibt in den meisten Fällen aus; man spricht von einer transitorischen ischämischen Attacke (TIA)<sup>8,11</sup>.

Im Kerngebiet eines ischämischen Schlaganfalls ist die Blutversorgung mangelhaft und die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) unzureichend. Da der Bedarf jedoch unverändert hoch bleibt, kommt es zu einer Azidose und Dysfunktion energieabhängiger Ionentransporter. Infolgedessen kommt es wiederum zu einem Anschwellen der Zellen, Ruptur der Plasmamembranen und zum Zelltod<sup>19</sup>. Der Infarktkern ist von einer peripheren Zone umgeben, der so genannten Penumbra (lateinisch: "Halbschatten"), in der zunächst nur die elektrische Erregbarkeit der Neurone verloren geht, ohne jedoch morphologische Schäden zu verursachen<sup>21</sup>. Innerhalb der ischämischen Penumbra wird das Absterben von Nerven- und anderen Hirnzellen nicht nur durch die begrenzte ATP-Verfügbarkeit verursacht, sondern resultiert aus einem komplexen Zusammenspiel biochemischer und zellulärer Mechanismen. Der Zelltod in diesem Bereich tritt im Vergleich zum Infarktkern später auf und kann durch die Reperfusion der Penumbra weitestgehend vermieden werden<sup>8</sup>. Bleibt die Reperfusion der Penumbra aus, wächst der Infarktkern auf Kosten der Penumbra<sup>8,21</sup>.

Histologisch findet sich im Kerngebiet des Infarkts eine Pannekrose, d. h. ein Absterben von Neuronen und andere Hirnzellen wie Mikroglia, Astrozyten, Oligodendrozyten und Endothelzellen<sup>22</sup>. Im Bereich der reperfundierte Penumbra kann es dagegen auch zum

Absterben einzelner Neurone („selective neuronal loss“, SNL) kommen<sup>22,23</sup>. SNL ist gekennzeichnet durch einen fleckigen oder schichtweisen Verlust von Neuronen wobei andere Zelltypen und Gewebsbestandteile überleben<sup>23</sup>. SNL kann auch in Hirnregionen vorkommen, die dem Infarktgebiet nicht benachbart, aber funktionell mit ihm verbunden sind und denen trophische oder exzitatorische Reize fehlen; man spricht von einer transneuronalen Degeneration<sup>23,24</sup>.

Zu den unmittelbaren zellschädigenden Mechanismen während einer Ischämie gehören Exzitotoxizität (d.h. inadäquate Freisetzung bzw. unzureichende Wiederaufnahme von exzitatorischen Neurotransmittern), oxidativer und nitrosativer Stress (d. h. Produktion hochreaktiver freier Sauerstoff- oder Stickstoffradikale) und periinfarktbedingte Depolarisationen (d. h. sich langsam ausbreitende Depolarisationswellen von Neuronen und Neuroglia mit hohem Energiebedarf). Bereits innerhalb von Minuten nach Beginn der Minderdurchblutung setzt im Gefäßkompartiment auch die postischämische Entzündungsreaktion ein. Oxidativer Stress und Entzündungsmediatoren tragen zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke bei und erleichtern sowohl die Einwanderung von im Blut zirkulierenden Entzündungszellen in das Hirnparenchym als auch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in den systemischen Kreislauf. Innerhalb des minderperfundierten Parenchyms setzen gestresste und absterbenden Zellen als Folge von Depolarisation oder Schädigung ihrer Zellmembranen Gefahrensignale („damage-associated molecular pattern molecules“, DAMPs) frei, die wiederum eine Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen, den Immunzellen des Gehirns, auslösen und durch die nachgeschaltete proinflammatorische Genexpression zu einer verstärkten Leukozyteninfiltration und Gewebsschädigung beitragen. Die postischämische Entzündung ist jedoch ein selbstlimitierender Prozess, der in den späteren Stadien eines ischämischen Schlaganfalls auch für die Beseitigung abgestorbener Zellen und die Produktion von Wachstumsfaktoren notwendig ist und zu Remodelling und Gewebsreparatur beiträgt (für Übersichtsarbeiten siehe<sup>25-27</sup>).

Die häufigsten Formen des Zelltods im ischämischen Hirngewebe sind Apoptose und Nekrose. Die Apoptose wird durch eine mäßige Einschränkung der Energiezufuhr verursacht und führt zu einem kontrollierten Zelltod mit anschließender Phagozytose. Im Gegensatz dazu wird die Nekrose durch eine hochgradige Einschränkung der Energiezufuhr hervorgerufen,

welche eine unkontrollierte Freisetzung intrazellulärer Bestandteile zur Folge hat und zur Gewebsschädigung beiträgt<sup>19</sup>. Ein knappes Dutzend weiterer Formen des neuronalen Zelltods im ischämischen Hirngewebe wurde bisher im Tiermodell beschrieben<sup>24</sup>. Sie umfassen unter anderem die Nekroptose<sup>28</sup> (ein rezeptorabhängiger Mechanismus mit morphologischen Merkmalen der Nekrose), die Autophagie<sup>29</sup> (ein Abbau zellulärer Komponenten durch Autophagosomen) und Parthanatos<sup>30</sup>, eine enzymabhängige Form des programmierten Zelltods.

### 1.2.1. Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen

Eine weitere Form des Zelltods ist die Phagoptose, der durch Phagozytose lebensfähiger Zellen induzierte Zelltod<sup>31,32</sup>. Lange Zeit wurde die Phagozytose als ausnahmslos nützlicher physiologischer Prozess angesehen, der zur Beseitigung potenziell schädlicher Zellbestandteile führt und zur Rückbildung von Entzündungsprozessen beiträgt<sup>33</sup>. Es wurde davon ausgegangen, dass Zellen erst dann phagozytiert werden, wenn der Zelltod unmittelbar bevorsteht bzw. bereits eingetreten ist<sup>34</sup>. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass lebensfähige Zellen, die subletalen Reizen ausgesetzt sind, spezifische Zelloberflächenmoleküle, sogenannte "eat-me"-Signale, exprimieren, was zu ihrer Phagozytose und damit zum Zelltod führt<sup>31,32,35</sup>. Phosphatidylserin (PS) ist das häufigste und am besten beschriebene eat-me-Signal<sup>24,36</sup>. PS kann von Neuronen reversibel als Reaktion auf zellulären Stress beispielsweise durch die übermäßige Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter oder freie Sauerstoff- oder Stickstoffradikale an der Zelloberfläche externalisiert werden<sup>31,32,37</sup>. In Anwesenheit von Phagozyten führt die PS-Exposition jedoch zur Phagozytose lebensfähiger Neurone und anschließendem Zelltod. In Abwesenheit von Phagozyten sind gestresste Neuronen in der Lage, PS wieder zu internalisieren und überleben<sup>31,32,36</sup>. Die PS-Externalisierung alleine ist also nicht ausreichend, um den Zelltod zu induzieren. Neuronales PS kann direkt an mikrogliale Transmembranrezeptoren oder indirekt unter Vermittlung löslicher Opsonine wie *Milk fat globule-EGF factor 8* (Mfge8) an phagozytische Rezeptoren wie *Mer tyrosine kinase* (MerTK) binden, was schließlich zur Phagozytose und zum Zelltod des eat-me-Signals-exponierenden Neurons führt<sup>31,32,38,39</sup>. Interessanterweise exprimieren auch lebensfähige Neuronen in der ischämischen Penumbra PS, wobei der Höhepunkt der Expression etwa 3 Tage nach einer transienten Ischämie erreicht ist und sich danach wieder zurückbildet<sup>40</sup>. Es ist daher denkbar,



dass die Phagoptose zum neuronalen Zelltod im ischämischen Hirngewebe und damit einhergehenden funktionellen Defiziten beiträgt.

Die normobare Oxygenierung (NBO) ist die Verabreichung von Sauerstoff unter normalem Atmosphärendruck mit dem Ziel, neuronalen Zelltod zu verhindern und das funktionelle Outcome nach einer cerebralen Ischämie zu verbessern. NBO wurde bislang sowohl in Nagetiermodellen als auch in randomisierten klinischen Studien untersucht. Die Ergebnisse sind uneinheitlich. In verschiedenen Nagetiermodellen wurde wiederholt eine Verringerung der Infarktgröße durch NBO beschrieben<sup>41-43</sup>. Andere Autoren berichten wiederum von einem fehlenden Nutzen der NBO<sup>44-47</sup>. Folglich gibt es derzeit keinen Konsens über die Vorteile der NBO im Tiermodell. Eine wahrscheinliche Ursache für diese Uneinheitlichkeit ist die von Modell zu Modell variierende Ischämiedauer. Eine Übersichtsarbeit zu diesem Thema verzeichnete 21 Studien zur NBO im Tiermodell, wobei eine Verringerung der Infarktgröße in 17 von 19 Untersuchungen mit einer Ischämiedauer < 2 h, 7 von 11 Untersuchungen mit einer Ischämiedauer von 2-3 h und 4 von 11 Untersuchungen mit einer Ischämiedauer > 3 h beobachtet wurden<sup>8</sup>. Die Metaanalyse ergab eine starke negative Korrelation zwischen der Reduktion der Infarktgröße und der Ischämiedauer<sup>8</sup>.

Nur eine Handvoll Studien hat bislang die Auswirkungen der NBO in Abhängigkeit vom Zeitpunkt bzw. der Dauer der Verabreichung untersucht. Singhal et al. (2002) zeigten, dass der Nutzen der NBO umso geringer ist, je später die Therapie begonnen wird<sup>41</sup>. Im Gegensatz zum Beginn der NBO 15 bzw. 30min nach Ende eines 2-stündigen transienten Verschlusses der mittleren Hirnarterie (MCAo) im Rattenmodell, zeigte sich nach 45min keine Verringerung der Infarktgröße durch die Therapie. Tiwari et al. (2016) zeigten wiederum, dass eine längere Dauer der NBO (25min bzw. 55min vs. 150min) nach Ende einer 60 bzw. 90-minütigen MCAo zu einer Verringerung der Infarktgröße führt<sup>48</sup>. Der Effekt einer normobaren Oxygenierung, die unmittelbar mit dem Beginn einer kurzzeitigen (15min) fokalen cerebralen Ischämie eingeleitet wird, wurde bislang nicht untersucht.

### 1.3. "Lost in translation" – Qualitätsmängel in der tierexperimentellen Forschung als Herausforderung für eine erfolgreiche Translation in die klinische Anwendung

In den vergangenen Jahrzehnten wurden anhand von tierexperimentellen Schlaganfallmodellen zahlreiche pathophysiologische Funktionsmechanismen entdeckt. Ebenso wurden eine Vielzahl an potentiell neuroprotektiven Behandlungsansätzen und -strategien identifiziert<sup>8-10</sup>. Die beachtlichen Erkenntnisse der tierexperimentellen Grundlagenforschung auch für menschliche Schlaganfallpatienten nutzbar zu machen - die sogenannte "Bench-to-Bedside"-Translation - ist jedoch bislang weitestgehend erfolglos geblieben<sup>12,13</sup>.

Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse sämtlicher Phase-3-Studien zur medikamentösen Behandlung des akuten ischämischen Schlaganfalls sowie der jeweiligen vorangegangenen früheren klinischen und experimentellen Studien illustriert diese Translationschwierigkeiten eindrücklich<sup>13</sup>: Die Studie ergab einen beachtlichen Abfall der Wirksamkeit eines Präparats auf dem Weg vom Tierversuch zur klinischen Anwendung. Von insgesamt 50 Phase-3-Studien mit 46.008 Probanden, 75 frühen klinischen Studien mit 12.391 Probanden und 209 experimentellen Studien mit >7.141 Tieren waren, gemessen an der Infarktgröße bzw. dem funktionellen Outcome, drei (6%) Phase 3, 24 (32%) frühe klinische und 143 (69%) tierexperimentelle Studien positiv. Wesentliche Translationshindernisse sind, neben den anatomischen und pathophysiologischen Speziesdifferenzen zwischen Tier und Mensch, die zum Teil gravierenden Unterschiede im Studiendesign wie beispielsweise eine unterschiedliche Dauer der bis zum Beginn der Behandlung verstrichenen Zeit oder die Wahl nicht vergleichbarer Endpunkte<sup>13,14,17</sup>. Ebenso tragen die Nichtberücksichtigung von Qualitätskriterien wie z.B. von Randomisierung und Verblindung zur Vermeidung von Stichprobenverzerrung (Bias), Publikationsbias (d. h. die bevorzugte Veröffentlichung von Studien mit positiven Ergebnissen) und eine unzureichende Stichprobengröße (Power) zur mangelnden Übertragbarkeit der tierexperimentellen Ergebnisse in die klinische Anwendung bei<sup>14,15</sup>. Ein weiterer häufig beobachteter Qualitätsmangel tierexperimenteller Studien ist der Verschleißbias bzw. Attrition-Bias (d. h. der zufällige oder beabsichtigte Ausschluss von Tieren ohne Angabe der Ausschlusskriterien)<sup>16</sup>. Eine Metaanalyse tierexperimenteller Schlaganfallstudien ergab, dass lediglich ein Drittel der Autoren berichtete, ob Tiere von der

Ergebnisauswertung ausgeschlossen wurden. Von denjenigen Autoren, die angaben, Tiere von der Ergebnisauswertung ausgeschlossen zu haben, gaben weniger als ein Viertel den Grund dafür an<sup>16</sup>. Zusammengefasst erzielen aufgrund der Nichtberücksichtigung von Qualitätskriterien vermutlich weniger als die Hälfte der veröffentlichten positiven tierexperimentellen Schlaganfallstudien auch tatsächlich einen positiven Therapieeffekt<sup>14,49</sup>.

Eine häufige Ursache für Verschleißbias ist die unzureichende Anwendung von Abbruchkriterien, welche insbesondere dann zu einer Verzerrung der Studienergebnisse führt, wenn die Gruppengrößen klein sind<sup>16,50</sup>. Ein Abbruchkriterium ist der "früheste Hinweis auf (potenzielle) Schmerzen und/oder Leiden, welcher im Einklang mit der wissenschaftlichen Fragestellung und ethischen Vertretbarkeit eines Tierversuchs verwendet werden kann, um Schmerzen und Leiden zu begrenzen, indem Maßnahmen zu deren Linderung, sowie zum Abbruch der Studie oder zur Tötung eines Tieres ergriffen werden"<sup>51</sup>. Die Anwendung von Abbruchkriterien zur Linderung der Schmerzen und Leiden ist darüber hinaus ein zentraler Bestandteil des Refinements von Tierversuchen (d. h. der Minimierung der durch einen Tierversuch verursachten Belastung), welches neben den Prinzipien Reduction (Verringerung der Tierzahl) und Replacement (Ersatzmethoden für Tierversuche) eine der drei Säulen des 3R-Prinzips darstellt<sup>52</sup>. Seit 2010 wurden mehrere Handlungsempfehlungen wie beispielsweise Gold Standard Publication Checklist (GCSP)<sup>53</sup>, Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE)<sup>54</sup>, ARRIVE 2.0<sup>55</sup> oder Ischaemia Models: Procedural Refinements Of in Vivo Experiments (IMPROVE)<sup>56</sup> veröffentlicht, welche allesamt eine nachvollziehbare Festlegung, Anwendung und Dokumentation von Abbruchkriterien fordern, um unnötiges Tierleid zu vermeiden und die Qualität und Reproduzierbarkeit tierexperimenteller Studien zu verbessern<sup>9,57</sup>.

Diese Handlungsempfehlungen werden bisher jedoch kaum angewandt. Eine Übersichtsarbeit verglich tierexperimentelle Studien miteinander, die in PLOS und Zeitschriften der Nature Publishing Group veröffentlicht wurden, jeweils zwei Jahre vor und nach Einführung der ARRIVE-Kriterien. Darin zeigte sich keine relevante Verbesserung des Berichtsstandards<sup>58</sup>. Eine weitere Untersuchung forderte knapp 1.700 Wissenschaftler auf, welche eine tierexperimentelle Arbeit bei PLOS ONE einreichten, vor Beginn der Einreichung die ARRIVE-Checklist auszufüllen. Die Studie kam es zu einem ähnlich schlechten Ergebnis<sup>59</sup>. Eine

retrospektive Untersuchung von Tierversuchserstanträgen aus 14 deutschen Bundesländern ergab, dass fast die Hälfte der Vorhaben, welche einen chirurgischen Eingriff erforderlich machten (n = 309/684), gänzlich auf die Angabe von Abbruchkriterien verzichteten<sup>60</sup>. Sofern Abbruchkriterien in Veröffentlichungen oder Tierversuchsanträgen berücksichtigt werden, sind diese in der überwiegenden Mehrheit unzureichend beschrieben, unspezifisch für das gewählte Tiermodell und finden meistens erst in einem späten Stadium des Experiments Anwendung<sup>60,61</sup>.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Abbruchkriterien in der tierexperimentellen Forschung tatsächlich unzureichend angewendet und nicht lediglich unzureichend beschrieben werden. Dadurch entsteht zum einen ein Risiko für Verschleißbias, was die interne Validität einer Studie verringert und deren Translation in die Klinik erschwert, zum anderen widerspricht diese Praxis den Grundsätzen des Refinements wodurch Tiere unnötigem Leid und Schmerzen ausgesetzt sind.

### 1.3.1. Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen

Maschinelles Lernen (ML), ein Teilbereich der künstlichen Intelligenz, beschreibt die automatische Verbesserung von Computeralgorithmen durch Erfahrung<sup>62</sup>. ML Algorithmen nutzen vorhandene Datensätze (d. h. Trainingsdaten), um daraus Muster und Gesetzmäßigkeiten abzuleiten, welche dann auf neue, bisher unbekannte Daten angewendet werden können, um Ereignisse vorherzusagen oder Entscheidungen zu treffen, ohne explizit dafür programmiert zu sein<sup>62,63</sup>. ML unterscheidet zwei grundsätzliche Lernansätze: überwachtes und unüberwachtes Lernen. In einem überwachten Lernmodell lernt der Algorithmus anhand eines annotierten Trainingsdatensatzes, d. h. dem Trainingsdatensatz sind bereits die gewünschten Ausgabeparameter zugeordnet. Ziel des überwachten Lernmodells ist es, eine Funktion zu finden, welche den gewünschten Ausgabeparameter bestmöglich vorhersagt. Unüberwachtes Lernen nutzt hingegen keine annotierten Datensätze, d. h. die gewünschten Ausgabeparameter sind unbekannt. Ziel des unüberwachten Lernens ist es, Muster zu erkennen und Gesetzmäßigkeiten abzuleiten<sup>63</sup>. Im Vergleich zu klassischen statistischen Methoden bietet ML vielseitige Anwendungsmöglichkeiten, insbesondere große und komplexe Datensätze hypothesenfrei zu analysieren<sup>63</sup>.

ML wird im Bereich der tierexperimentellen Forschung bislang vor allem zur Analyse von Tierverhalten wie beispielsweise der lokomotorischen Aktivität<sup>64-66</sup>, kleinräumiger Bewegungen<sup>67</sup>, oder des Sozialverhaltens eingesetzt<sup>68</sup>, da diese Datensätze üblicherweise eine hohe Datendichte und -komplexität aufweisen. Bislang wurde ML noch nicht zur Vorhersage von Abbruchkriterien in Tierversuchen angewendet. Auch klassische statistische Methoden wie beispielsweise Regressionsanalysen werden nur von einer Minderheit der Autoren zur Bestimmung von Abbruchkriterien verwendet<sup>61</sup>. Vielmehr beruhen Abbruchkriterien häufig auf der willkürlichen Auswahl eines Parameters bzw. Grenzwertes, welcher eine bestmögliche Trennung zwischen Tieren mit hoher und niedriger Überlebenswahrscheinlichkeit verspricht<sup>61</sup>. Folglich sind Abbruchkriterien in wissenschaftlichen Veröffentlichungen häufig schwer nachvollziehbar oder nicht repräsentativ, deren Aussagekraft und Reproduzierbarkeit eingeschränkt und die Tiere daher unnötigem Leid ausgesetzt<sup>61,69</sup>.

Die am häufigsten zur Festlegung humaner Endpunkte herangezogenen Parameter sind Punkteskalen zur Belastungsbewertung, Körpergewicht und -temperatur. Die rektale Messung ist die am häufigsten verwendete Methode zur Temperaturbestimmung bei Mäusen, wobei das Verfahren mit einer erhöhten Stressbelastung und Verletzungsgefahr für die Tiere einhergeht<sup>70</sup>. Im Gegensatz dazu reduzieren nicht-invasive Temperaturmessverfahren wie die berührungslose Infrarot-Thermometrie Stressbelastung und Verletzungsrisiko<sup>71</sup>, kommen bislang aber nur selten zur Anwendung.

#### 1.4. Zielsetzung und wissenschaftliche Fragestellungen

Die dieser kumulativen Habilitationsschrift zugrundeliegenden Arbeiten hatten zum Ziel, neue Therapieansätze zur Behandlung eines Schlaganfalls und Methoden zur Verbesserung des Refinements von Tierversuchen experimentell zu untersuchen, um damit zu einer erfolgreichen Translation neuer Therapieansätze aus der tierexperimentellen Forschung in die Klinik beizutragen. Im Einzelnen wurde untersucht, ob:

1. Der Zelltod durch Phagoptose, d. h. der durch Phagozytose lebensfähiger Neurone induzierte Zelltod, einen relevanten Schädigungsmechanismus im ischämischen Hirngewebe darstellt und inwieweit eine Hemmung der Phagozytoseaktivität das funktionelle und histologische Outcome nach einer fokalen cerebralen Ischämie verbessert (Arbeit 1).
2. Eine frühe normobare Oxygenierung nach kurzzeitiger fokaler cerebraler Ischämie den neuronalen Zelltod (d.h. selektiver neuronaler Zellverlust) und damit einhergehende funktionelle Defizite verringert (Arbeiten 2 und 3).
3. Maschinelles Lernen geeignet ist, um Abbruchkriterien in belastenden Tierversuchen anhand von einzelnen physiologischen Parametern, wie beispielsweise der Körpertemperatur oder von Parameterkombination, vorherzusagen (Arbeiten 4 und 5).

## 2. EIGENE ARBEITEN

### 2.1. Phagozytose verursacht neuronalen Zelltod nach fokaler Hirnischämie

Diese Arbeit konnte nachweisen, dass Zelltod durch Phagozytose, d. h. der durch Phagozytose lebensfähiger Neurone induzierte Zelltod, ein relevanter Schädigungsmechanismus im ischämischen Hirngewebe war und die Hemmung der Phagozytoseaktivität das funktionelle und histologische Outcome nach einer fokalen cerebralen Ischämie verbesserte.

Der nachfolgende Text entspricht dem originalsprachlichen Abstrakt der Arbeit "Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia" von Neher, J.J., Emmrich, J.V., Fricker, M., Mander, P.K., Théry, C., Brown, G.C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, E4098-4107, volume 110(43), doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1308679110>.

"Delayed neuronal loss and brain atrophy after cerebral ischemia contribute to stroke and dementia pathology, but the mechanisms are poorly understood. Phagocytic removal of neurons is generally assumed to be beneficial and to occur only after neuronal death. However, we report herein that inhibition of phagocytosis can prevent delayed loss and death of functional neurons after transient brain ischemia. Two phagocytic proteins, Mer receptor tyrosine kinase (MerTK) and Milk fat globule EGF-like factor 8 (MFG-E8), were transiently up-regulated by macrophages/microglia after focal brain ischemia in vivo. Strikingly, deficiency in either protein completely prevented long-term functional motor deficits after cerebral ischemia and strongly reduced brain atrophy as a result of inhibiting phagocytosis of neurons. Correspondingly, in vitro glutamate-stressed neurons reversibly exposed the "eat-me" signal phosphatidylserine, leading to their phagocytosis by microglia; this neuronal loss was prevented in the absence of microglia and reduced if microglia were genetically deficient in MerTK or MFG-E8, both of which mediate phosphatidylserine-recognition. Thus, phagocytosis of viable neurons contributes to brain pathology and, surprisingly, blocking this process is strongly beneficial. Therefore, inhibition of specific phagocytic pathways may present therapeutic targets for preventing delayed neuronal loss after transient cerebral ischemia."

## 2.2. Vergleich von automatisierten quantitativen versus semiquantitativen immunhistochemischen Auswertungsmethoden zur Beurteilung von selektivem neuronalem Zellverlust und Mikrogliaaktivierung nach transienter fokaler Hirnischämie

Diese Arbeit galt dem Vergleich zweier immunhistochemischer Methoden zur Quantifizierung von SNL und aktivierter Mikroglia nach transienter fokaler cerebraler Ischämie, welche der nachfolgenden Arbeit als methodische Grundlage diene.

Der nachfolgende Text entspricht dem originalsprachlichen Abstrakt der Arbeit "Regional distribution of selective neuronal loss and microglial activation across the MCA territory after transient focal ischemia: Quantitative versus semiquantitative systematic immunohistochemical assessment" von Emmrich, J.V., Ejaz, S., Neher, J.J., Williamson, D.J., Baron, J.C. *J Cereb Blood Flow Metab.* January 2015, 20-27, volume 35(1), doi: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.181>.

"Histopathologic assessment in transient middle cerebral artery occlusion (MCAo) rodent models generally lacks comprehensiveness and exposes to interobserver bias. Here we compared a novel quantitative assessment of regional infarction, selective neuronal loss (SNL) and microglial activation (MA) across the MCA territory to a previously published semiquantitative visual protocol. NeuN and OX42 immunohistochemistry was applied after either 15 or 45 minutes distal MCAo to maximize SNL and infarction, respectively. Survival times varied from 28 to 60 days to cover potential biases such as delayed tissue shrinkage. Damage was assessed using a template of 44 cytoarchitectonic regions of interest (ROIs) mapped onto a subset of digitized coronal sections spanning the MCA territory. For each ROI were obtained a semiquantitative visually determined index of histopathologic changes (method 1), and ipsilateral/contralateral ratios of remaining neurons and activated microglia cell counts (method 2). There was excellent agreement between the two methods for 28-day survival for both MCAo durations, whereas method 2 more sensitively detected subtle SNL and MA at 45 days and 60 days after 15-minute MCAo. Thus, the visual method is accurate for usual degrees of ischemic damage, but absolute cell quantification is superior to detect subtle changes and should therefore be preferred in brief MCAo models, although requires optimal staining quality."



### 2.3. Normobare Oxygenierung reduziert Hirnschäden und sensomotorische Defizite nach kurzzeitiger fokaler Hirnischämie

Diese Arbeit zeigte, dass eine fokale cerebrale Ischämie mit rascher Reperfusion SNL im sonst intakten Hirngewebe zur Folge hatte und mit funktionellen Defiziten einherging, welche durch eine frühe normobare Oxygenierung verhindert werden konnten.

Der nachfolgende Text entspricht dem originalsprachlichen Abstrakt der Arbeit "Normobaric hyperoxia markedly reduces brain damage and sensorimotor deficits following brief focal ischaemia" von Ejaz, S.\*, Emmrich, J.V.\*, Sitnikov, S.L., Hong, Y.T., Sawiak, S.J., Fryer, T.D., Aigbirhio, F.I., Williamson, D.J., Baron, J.-C. *Brain*. March 2016, 751-764, volume 139 (Pt 3), doi: <https://doi.org/10.1093/brain/awv391>. (\* geteilte Erstautorenschaft)

"True transient ischaemic attacks are characterized not only clinically, but also radiologically by a lack of corresponding changes on magnetic resonance imaging. During a transient ischaemic attack it is assumed that the affected tissue is penumbral but rescued by early spontaneous reperfusion. There is, however, evidence from rodent studies that even brief focal ischaemia not resulting in tissue infarction can cause extensive selective neuronal loss associated with long-lasting sensorimotor impairment but normal magnetic resonance imaging. Selective neuronal loss might therefore contribute to the increasingly recognized cognitive impairment occurring in patients with transient ischaemic attacks. It is therefore relevant to consider treatments to reduce brain damage occurring with transient ischaemic attacks. As penumbral neurons are threatened by markedly constrained oxygen delivery, improving the latter by increasing arterial O<sub>2</sub> content would seem logical. Despite only small increases in arterial O<sub>2</sub> content, normobaric oxygen therapy experimentally induces significant increases in penumbral O<sub>2</sub> pressure and by such may maintain the penumbra alive until reperfusion. Nevertheless, the effects of normobaric oxygen therapy on infarct volume in rodent models have been conflicting, although duration of occlusion appeared an important factor. Likewise, in the single randomized trial published to date, early-administered normobaric oxygen therapy had no significant effect on clinical outcome despite reduced diffusion-weighted imaging lesion growth during therapy. Here we tested the hypothesis that normobaric oxygen therapy prevents both selective neuronal loss and sensorimotor deficits in

a rodent model mimicking true transient ischaemic attack. Normobaric oxygen therapy was applied from the onset and until completion of 15 min distal middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats, a strain representative of the transient ischaemic attack-prone population. Whereas normoxic controls showed normal magnetic resonance imaging but extensive cortical selective neuronal loss associated with microglial activation (present both at Day 14 in vivo and at Day 28 post-mortem) and marked and long-lasting sensorimotor deficits, normobaric oxygen therapy completely prevented sensorimotor deficit ( $P < 0.02$ ) and near-completely Day 28 selective neuronal loss ( $P < 0.005$ ). Microglial activation was substantially reduced at Day 14 and completely prevented at Day 28 ( $P = 0.002$ ). Our findings document that normobaric oxygen therapy administered during ischaemia nearly completely prevents the neuronal death, microglial inflammation and sensorimotor impairment that characterize this rodent true transient ischaemic attack model. Taken together with the available literature, normobaric oxygen therapy appears a promising therapy for short-lasting ischemia and is attractive clinically as it could be started at home in at-risk patients or in the ambulance in subjects suspected of transient ischaemic attack/early stroke. It may also be a straightforward adjunct to reperfusion therapies and help prevent subtle brain damage potentially contributing to long-term cognitive and sensorimotor impairment in at-risk populations.”

## 2.4. Vorhersage von Abbruchkriterien in tierexperimentellen Mausmodellen durch maschinelles Lernen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wiesen darauf hin, dass Abbruchkriterien für Tierversuche anhand einzelner physiologischer Parameter oder von Parameterkombination durch überwachte maschinelle Lernmodelle mit hoher Genauigkeit und zu einem frühen Zeitpunkt eines Experiments vorhergesagt werden konnten, wodurch sich die Qualität einer tierexperimentellen Studie erhöhen und unnötiges Tierleid vermindern ließen.

Der nachfolgende Text entspricht dem originalsprachlichen Abstrakt der Arbeit "Refining humane endpoints in mouse models of disease by systematic review and machine learning-based endpoint definition" von Mei, J., Banneke, S., Lips, J., Kuffner, M., Hoffmann, C., Dirnagl, U., Endres, M., Harms, C., Emmrich, J.V. *ALTEX*. April 2019, 555-571, volume 36(4), doi: <https://doi.org/10.14573/altex.1812231>.

"Ideally, humane endpoints allow for early termination of experiments by minimizing an animal's discomfort, distress and pain, while ensuring that scientific objectives are reached. Yet, lack of commonly agreed methodology and heterogeneity of cut-off values published in the literature remain a challenge to the accurate determination and application of humane endpoints. With the aim to synthesize and appraise existing humane endpoint definitions for commonly used physiological parameters, we conducted a systematic review of mouse studies of acute and chronic disease models, which used body weight, temperature and/or sickness scores for endpoint definition. In the second part of the study, we used previously published and unpublished data on weight, temperature and sickness scores from mouse models of sepsis and stroke and applied machine learning algorithms to assess the usefulness of this method for parameter selection and endpoint definition across models. Studies were searched for in two electronic databases (MEDLINE/Pubmed and Embase). Out of 110 retrieved full-text manuscripts, 34 studies were included. We found large intra- and inter-model variance in humane endpoint determination and application due to varying animal models, lack of standardized experimental protocols and heterogeneity of performance metrics (part 1). Machine learning models trained with physiological data and sickness severity score or modified DeSimoni neuroscore identified animals with a high risk of death at an early time point

in both mouse models of stroke (male: 93.2% at 72h post-treatment; female: 93.0% at 48h post-treatment) and sepsis (96.2% at 24h post-treatment), thus demonstrating generalizability in endpoint determination across models (part 2).”

## 2.5. Körpertemperatur als Abbruchkriterium in tierexperimentellen Mausmodellen: Implantierbarer Temperaturtransponder versus Infrarotmessung

Mit dieser Untersuchung wiesen wir nach, dass die Vorhersage von Abbruchkriterien durch maschinelle Lernmodelle anhand von Körperkern- oder oberflächentemperatur gleichermaßen möglich war und somit aufwändige Transpondersysteme ebenso gut wie handelsübliche Infrarotthermometer zur Temperaturerfassung geeignet waren.

Der nachfolgende Text entspricht dem originalsprachlichen Abstrakt der Arbeit "Body temperature measurement in mice during acute illness: Implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry" von Mei, J., Riedel, N., Grittner, U., Endres, M., Banneke, S., Emmrich, J.V. *Sci Rep.* February 2018, 3526, volume 8(1), doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22020-6>.

"Body temperature is a valuable parameter in determining the wellbeing of laboratory animals. However, using body temperature to refine humane endpoints during acute illness generally lacks comprehensiveness and exposes to inter-observer bias. Here we compared two methods to assess body temperature in mice, namely implanted radio frequency identification (RFID) temperature transponders (method 1) to non-contact infrared thermometry (method 2) in 435 mice for up to 7 days during normothermia and lipopolysaccharide (LPS) endotoxin-induced hypothermia. There was excellent agreement between core and surface temperature as determined by method 1 and 2, respectively, whereas the intra- and inter-subject variation was higher for method 2. Nevertheless, using machine learning algorithms to determine temperature-based endpoints both methods had excellent accuracy in predicting death as an outcome event. Therefore, less expensive and cumbersome non-contact infrared thermometry can serve as a reliable alternative for implantable transponder-based systems for hypothermic responses, although requiring standardization between experimenters."

### 3. DISKUSSION

Die dieser kumulativen Habilitationsschrift zugrundeliegenden Arbeiten hatten zum Ziel, neue Therapieansätze nach fokaler cerebraler Ischämie zu untersuchen und einen Beitrag zur Verbesserung von Qualität und Refinement der tierexperimentellen Schlaganfallforschung zu leisten. Einerseits untersuchten wir die Auswirkungen einer verminderten Phagozytoseaktivität bzw. einer frühen normobaren Oxygenierung auf das histologische und funktionelle Outcome nach fokaler cerebraler Ischämie in Maus- und Rattenmodellen. Andererseits untersuchten wir die Eignung maschineller Lernmodelle für die Vorhersage von Abbruchkriterien.

Die Einschränkung der Phagozytoseaktivität verringert die Hirnatrophie und verbessert das funktionelle Outcome nach fokaler Endothelin-1 induzierter cerebraler Ischämie<sup>37</sup>. Das Ziel dieser grundlagenwissenschaftlichen Arbeit war die Untersuchung, ob eine eingeschränkte Phagozytoseaktivität (d. h. fehlende phagozytotische Proteine MFG-E8 bzw. MerTK) die Infarktgröße verringern bzw. das funktionelle Outcome nach einer durch Injektion des vasokonstriktiven Peptids Endothelin-1 (ET-1) induzierten fokalen zerebralen Ischämie verbessern kann. Wir stellten fest, dass Tiere, denen das Opsonin MFG-E8 (Maus) oder der phagozytische Rezeptor MerTK (Ratte) fehlten, im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp eine geringere Hirnatrophie sowie ein besseres funktionelles Outcome für bis zu 28 Tage nach Schlaganfall aufwiesen; die Infarktgröße war unverändert. Die Phagozytose von Neuronen war bei den phagozytosedefizienten Mfge8- und Mertk-Tieren reduziert, wobei die Anzahl der phagozytisch aktiven Zellen im Infarktgebiet sowie die Entzündungsreaktion im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp keine Unterschiede aufwiesen. Folglich ist anzunehmen, dass ein Mangel an den phagozytischen Proteinen MFG-E8 oder MerTK die Phagozytose von Neuronen durch Mikroglia oder aus dem zirkulierenden Blut eingewanderte Makrophagen blockieren und den neuronalen Zelltod verhindern kann. Zusammenfassend konnten wir erstmalig zeigen, dass neuronaler Zelltod durch Phagozytose ein relevanter Schädigungsmechanismus im ischämischen Hirngewebe ist und die Hemmung der Phagozytoseaktivität einen möglichen therapeutischen Ansatz für die Schlaganfalltherapie darstellt<sup>37</sup>.

Dieses Konzept wurde mittlerweile auch von anderen Gruppen bestätigt. Eine elegante Studie konnte kürzlich zeigen, dass eine Hemmung des Komplementsystems im ischämischen Hirngewebe den neuronale Zelltod durch Phagoptose verhindern kann. Zu diesem Zweck machten sich Alawieh et al. (2018)<sup>72</sup> zunutze, dass das Komplementsystem durch Immunglobulin M-Antikörper aktiviert wird, welche an DAMPs (sogenannte Neoepitope, die an der Zelloberfläche gestresster und sterbender Neurone im ischämischen Maushirn exprimiert werden) binden, und als "eat-me"-Signale dienen<sup>73</sup>. Durch den Einsatz eines einkettigen von monoklonalem IgM abgeleiteten Antikörpers, welcher spezifisch ein postischämisches Neoepitop (Annexin-IV) erkennt und mit einem Komplementinhibitor (CRRY, Ortholog des menschlichen Komplementrezeptors 1) verbunden ist, konnte die Komplementaktivierung und der neuronale Zelltod durch Phagoptose spezifisch im ischämischen Hirngewebe verhindert werden. Mäuse, die 2 bzw. 6 Stunden nach einem einstündigen transienten Verschluss der mittleren Hirnarterie (MCAo) mit einer Einmaldosis des Antikörpers behandelt wurden, hatten eine geringere Infarktgröße und wiesen langfristig geringer ausgeprägte motorische und kognitive Defizite auf. Besonders vielversprechend ist, dass dieser Effekt ebenso in erwachsenen und alten Mäusen beider Geschlechter nachgewiesen werden konnte wie auch nach einer verspäteten Verabreichung des Antikörpers bis zu 24h nach Schlaganfall. Darüber hinaus konnte in Hirnschnitten von Patienten, die an einem akuten Schlaganfall verstorben waren, eine starke Bindung des Antikörpers im ischämischen Hirngewebe festgestellt werden, nicht jedoch auf der kontralateralen Seite, was das hohe translationale Potential dieser Untersuchung unterstreicht<sup>74</sup>.

Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass die Calcium-aktivierte Phospholipid-Scramblase TMEM16F, welche für den schnellen Austausch des "eat-me"-Signals PS zwischen den beiden Lagen der Lipidschicht der Zellmembran verantwortlich ist, nach transientser MCAo im Rattenmodell hochreguliert wird. Der Knockdown von TMEM16F durch virenvermittelte RNA-Interferenz führt wiederum zu einer Verringerung von Infarktgröße und neurologischen Defiziten<sup>75</sup>. Das deutet darauf hin, dass gestresste, aber lebensfähige Neurone durch die verringerte Präsentation des "eat-me"-Signals PS an der Zelloberfläche vor dem Zelltod durch Phagoptose geschützt sind. Zusammengefasst haben beide Studien und unsere Beobachtungen gemeinsam, dass ein Zelltod durch Phagoptose frühestens 24 h nach Beginn der fokalen Ischämie auftritt und für mehrere Tagen bis Wochen nachweisbar ist. Hierdurch könnte die Hemmung der Phagozytose eine Therapiemöglichkeit auch jenseits des akuten,

zeitlich eng begrenzten Behandlungszeitfensters eines akuten ischämischen Schlaganfalls bieten. Kürzlich wurde beobachtet, dass der neuronale Zelltod durch Phagozytose möglicherweise auch durch nicht-zellautonome Signalübertragung ausgelöst werden kann. Ergebnisse einer Untersuchung in einem Maus- bzw. Rattenmodell nach transientser MCAo (1h Maus, 1,5h Ratte) deuten darauf hin, dass die Kommunikation zwischen Neuronen und Mikroglia im ischämischen Hirngewebe auch über Exosomen (d. h. extrazelluläre Vesikel, welche microRNA (miRNA) als Informationsträger transportieren) möglich ist. Die Überexpression einer bestimmten miRNA (miR-98) hemmt gezielt die Expression des phagozytischen Rezeptors Thrombozyten-aktivierender Faktor-Rezeptor („platelet-activating factor receptor“) wodurch die Phagozytose gestresster, aber lebensfähiger Neurone verhindert wird; Infarktgröße und funktionelle Defizite nehmen ab<sup>76</sup>.

Die Phagozytose ist jedoch mitnichten nur schädlich, sondern gleichwohl ein schützender pathophysiologischer Mechanismus, welcher der effizienten Beseitigung von abgestorbenen Zellen und Gewebstrümmern dient. Dadurch stellt sie eine wichtige Voraussetzung für Reparaturprozesse und die Reorganisation der neuronalen Vernetzung nach einem Schlaganfall dar<sup>77,78</sup>. Eine Hemmung der Phagozytose kann folglich auch nachteilige Wirkungen auf das histologische und funktionelle Outcome nach Schlaganfall haben. Der phagozytische purinerge Rezeptor P2Y6 kann durch das Diisothiocyanat-Derivat MRS (MRS2578), einen selektiven Antagonist und effektiven Inhibitor der mikroglialen Phagozytose gehemmt werden<sup>79</sup>. Wurde MRS2578 nach transientser MCAo (90min) in einem Mausmodell für bis zu 3 Tage intraperitoneal appliziert, waren Hirnatrophie und Schweregrad der motorischen Beeinträchtigung bis zu 14 Tage nach Schlaganfall verstärkt, die Infarktgröße blieb jedoch unverändert<sup>80</sup>. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Studien mit genetisch veränderten Mäusen, welche jeweils für die Phagozytose relevante Rezeptoren gezielt ausschalteten. Neonatale Mäuse mit CD36-Knockout weisen am ersten Tag nach Schlaganfall ein vergrößertes Infarktareal auf<sup>81</sup>; adulte Mäuse mit TREM2-Knockout weisen für bis zu 14 Tage nach Schlaganfall ein vergrößertes Infarktareal auf und haben ein schlechteres funktionelles Outcome<sup>82</sup>.

Zusammengenommen zeigt sich, dass eine Hemmung der Phagozytose nach fokaler cerebraler Ischämie sowohl nützliche als auch schädliche Auswirkungen haben kann, die



insbesondere von der Art des inhibierten phagozytischen Signalwegs und dem Zeitraum der Phagozytosehemmung (transient vs. permanent) abhängen. Vor diesem Hintergrund sollte das Augenmerk zukünftiger Studien darauf liegen, welcher Therapieansatz eine möglichst spezifische und vorübergehende Hemmung der Phagozytose erlaubt, um die physiologische Gewebshomöostase und Reparatur- und Umbauprozesse im geschädigten Hirngewebe nicht zu beeinträchtigen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwiefern eine Hemmung der Phagozytose das Infektionsrisiko für bakterielle Erreger erhöht, welches bei menschlichen Patienten eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität nach Schlaganfall darstellt, wobei bislang keine erhöhte Infektionsneigung durch eine Hemmung der Phagozytose nach fokaler cerebraler Ischämie im Tiermodell beobachtet wurde<sup>32,37,72</sup>.

Die Untersuchung dieser und anderer Fragestellungen ist Gegenstand laufender Experimente unserer Arbeitsgruppe. Zur vorübergehenden medikamentösen Hemmung der Phagozytose nutzen wir EMD121974 (Cilengitide), einen kommerziell erhältlichen Phagozytoseinhibitor (Antagonist am Vitronectin-Rezeptor), welcher die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und dessen Sicherheit und Verträglichkeit in klinischen Phase I/II-Studien zur Behandlung des Glioblastoms bereits erfolgreich nachgewiesen wurden<sup>83</sup>. Unserer bisherigen Ergebnisse reproduzieren wir in einem Maus-Schlaganfallmodell (45-minütige transiente MCAo) mit großen Gruppengrößen (n = 20 pro Gruppe) und einem gruppensequentiellen Studiendesign. Das Studienprotokoll wurde präregistriert, um die Ziele der Untersuchung, das Studiendesign und die geplante Auswertung transparent darzustellen und die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen<sup>84</sup>.

**Normobare Hyperoxie verringert neuronalen Zellverlust und verbessert das funktionelle Outcome nach kurzzeitiger fokaler Ischämie<sup>85,86</sup>.** Das Ziel dieser Arbeiten war die Untersuchung, ob frühe normobare Oxygenierung (NBO), d. h. die Verabreichung von Sauerstoff unter normalem Atmosphärendruck, SNL verhindern und das funktionelle Outcome nach einer kurzzeitigen fokalen cerebralen Ischämie im Tiermodell verbessern kann. Zu diesem Zweck wurde bei spontan hypertensiven Ratten die distale mittlere Hirnarterie für 15 Minuten mit einer Mikroklammer verschlossen; die Sauerstoffapplikation erfolgte währenddessen über eine Nasenmaske. Für das Tiermodell und die histologische Auswertung griffen wir auf methodische Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zurück<sup>86,87</sup>. Wir fanden heraus, dass NBO den

selektiven neuronalen Zellverlust fast vollständig verhindern konnte; Tiere, die mit NBO behandelt wurden, hatten kein sensomotorisches Defizit<sup>85</sup>.

Zusammengefasst deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass eine NBO nach kurzzeitiger MCAo eine vielversprechende Therapiemethode darstellt. Sie stützen die Beobachtung, dass eine Rettung der Penumbra durch NBO nur dann möglich ist, wenn eine möglichst frühe Reperfusion des ischämischen Gewebes stattfindet<sup>8</sup>.

Ein wichtiger Punkt, den unsere Ergebnisse im Hinblick auf das mögliche Translationspotential in die klinische Anwendung aufwerfen, ist die Frage, wie früh nach dem Auftreten einer fokalen cerebralen Ischämie mit der NBO begonnen werden sollte. Wir entschieden uns dafür, die NBO zeitgleich mit dem Gefäßverschluss zu beginnen, um einen potenziellen Nutzen dieser Therapie zu maximieren. Obwohl es denkbar wäre, dass Patienten mit hohem Schlaganfall-Risiko bzw. deren Angehörigen bei entsprechender Schulung eine tragbare Sauerstoffflasche mit sich führen und die Sauerstoffapplikation unmittelbar beim Auftreten von Symptomen einleiten, vergehen in jedem Fall einige Minuten bis zum Therapiebeginn. Insofern ist das von uns gewählte Studiendesign nicht gänzlich auf eine klinische Studie übertragbar, das Translationspotential ist begrenzt. Folglich sind weitere tierexperimentelle Untersuchungen nötig, um die Auswirkungen einer NBO zu untersuchen, die erst zu einem späteren Zeitpunkt, beispielsweise 5-10 Minuten nach einer fokalen cerebralen Ischämie (d.h. MCAo) einsetzt.

Interessanterweise konnte kürzlich mittels positronenemissionstomographischer Untersuchungen erstmalig nachgewiesen werden, dass es im Bereich der Penumbra, die durch rechtzeitige Reperfusion vor einem drohenden Infarkt gerettet wurde, auch beim Menschen zu SNL kommt<sup>88</sup>. Die erfolgreiche Translation der NBO in die klinische Anwendung ist jedoch bisher nicht geglückt. Sämtliche prospektiven klinischen Studien ergaben keinen Therapieeffekt der NBO auf die Mortalität oder das langfristige funktionelle Outcome nach einem ischämischen Schlaganfall. Drei monozentrische Studien konnten keinen Effekt der NBO innerhalb von 12 h bis 24 h nach Symptombeginn auf das funktionelle Outcome bis zu 7 Monaten bzw. das 1-Jahres-Überleben nachweisen<sup>89-91</sup>. Sinhgall et al.<sup>92,93</sup> und Gonzalez et al.<sup>94</sup> berichteten über eine vorübergehende Verbesserung des Outcomes in einer kleinen Patientengruppe mit bildgebendem Nachweis eines Perfusion-Diffusion-Mismatches – also dem Nachweis einer

Penumbra innerhalb von 12 Stunden nach Symptombeginn – jedoch blieb ein Effekt auf das funktionelle Outcome nach 3 Monaten aus. Ähnlich zeigte die Stroke Oxygen Supplementation Study (Beginn der NBO innerhalb von 24 h) ein verbessertes funktionelles Outcome nach einer Woche und einen Trend hinsichtlich eines Behandlungsvorteils durch NBO, jedoch keinen signifikanten Unterschied nach 6 Monaten<sup>95,96</sup>. Schließlich zeigte die größte bisher durchgeführte prospektive klinische Studie in Großbritannien (n = 8003 Patienten, Einschluss bis 24 h nach Symptombeginn) keinen Unterschied hinsichtlich der Mortalität oder des funktionellen Outcomes nach 3 Monaten zwischen Patienten, die entweder über 72 Stunden kontinuierlich Sauerstoff erhielten, lediglich nachts behandelt wurden (d. h. in einem Zeitraum währenddessen Hypoxämien nach Schlaganfall häufiger auftreten) oder keine Sauerstofftherapie erhielten<sup>97,98</sup>. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen eines Therapieerfolgs der NBO könnte jedoch, ähnlich wie im Tiermodell, auch hier der späte Beginn der NBO sein – also zu einem Zeitpunkt, wenn die Penumbra bereits infarziert und einer Rettung nicht mehr zugänglich ist. So betrug beispielsweise die Zeit von Symptombeginn bis zur Randomisierung in mehreren der genannten Studien bis zu 24 Stunden<sup>90,95–98</sup>. Weitere mögliche Ursachen für die überwiegend negativen Studienergebnisse umfassen unter anderem den Einschluss weitestgehend unselektierter Patientengruppen mit der klinischen Diagnose eines akuten Schlaganfalls jedoch ohne radiologische Bildgebung, den Ausschluss von Patienten die eine rekanalisierende Therapie (Lyse oder mechanische Rekanalisation) erhielten, sowie die Verabreichung von low-flow Sauerstoff (< 3 l/min), welche zwar zu einer Erhöhung der peripheren Sauerstoffsättigung führt, jedoch nicht ausreicht, um Desaturierungen zu vermeiden<sup>97</sup>.

Keine der bislang durchgeführten klinischen Studien berücksichtigte jedoch die zwei aus tierexperimentellen Untersuchungen ableitbaren Grundsätze für einen Therapieerfolg von NBO: Frühestmöglicher Beginn und schnelle Reperfusion. Zwei aktuell laufende multizentrische klinische Studien widmen sich nun diesen Fragestellungen und untersuchen die frühe Verabreichung von high-flow Sauerstoff (> 10 l/min) bis 6 h bzw. bei Nachweis eines Perfusions-Diffusions-Mismatches im MRT bis 24 h nach Symptombeginn (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03620370) bzw. der sehr frühen Verabreichung von high-flow Sauerstoff (> 40 l/min) bis 3 h nach Symptombeginn, wobei für diese Patientengruppe ebenfalls eine hohe Wahrscheinlichkeit für die erfolgreiche Durchführung rekanalisierender Therapien gegeben ist

(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03500939). Weitere Fragen an zukünftige klinische Studien zur frühen NBO Therapie umfassen zum einen deren Auswirkungen im Falle eines hämorrhagischen Schlaganfalls, welcher sich ohne vorangegangene Bildgebung nicht ausschließen lässt und zum anderen deren mögliche Interaktion mit einer Lysetherapie. Bisherige Studien ergaben jedoch keinen Anhalt dafür, dass eine NBO Therapie die Mortalität oder das funktionelle Outcome nach einem hämorrhagischen Schlaganfall verschlechtert oder die Effektivität einer Lysetherapie nach einem ischämischen Schlaganfall beeinträchtigt<sup>97,98</sup>.

Nicht zuletzt aufgrund der allgegenwärtigen Verfügbarkeit, der geringen Therapiekosten und auch hinsichtlich der potentiellen Anwendungsmöglichkeiten erscheint eine frühe NBO Therapie attraktiv: So könnte NBO beispielsweise bei Verdacht auf einen Schlaganfall bereits prähospital verabreicht werden oder als Ergänzung einer rekanalisierenden Therapie dienen. Zusätzlich wäre es denkbar, dass, wie bereits erwähnt, Patienten mit hohem Schlaganfallrisiko bzw. deren Angehörige eine Sauerstofftherapie bereits beim Auftreten von Symptomen selbst einleiten.

**Der Einsatz maschineller Lernmodelle erlaubt die frühzeitige Vorhersage von Abbruchkriterien in Tierversuchen<sup>61,99</sup>.** Das Ziel dieser Arbeiten war die Untersuchung, ob maschinelles Lernen dazu geeignet ist, Abbruchkriterien in belastenden Tierversuchen anhand von physiologischen Parametern frühzeitig vorherzusagen. Zu diesem Zweck trainierten wir ein überwacht maschinelles Lernmodell mit den folgenden Parametern von 922 Mäusen nach MCAo bzw. endotoxininduzierter Sepsis: Körperkern- oder oberflächentemperatur, Körpergewicht sowie des anhand eines Score-Sheets ermittelten Schweregrads der Erkrankung. Das Lernmodell war in der Lage, anhand einzelner Parameter bzw. anhand von Parameterkombinationen die Abbruchwahrscheinlichkeit einzelner Tiere mit einer hohen Genauigkeit und bereits zu einem frühen Zeitpunkt des Experiments vorherzusagen<sup>61</sup>. Ebenso stellten wir fest, dass eine Vorhersage von Abbruchkriterien anhand von Körperkern- oder oberflächentemperatur gleichermaßen möglich war und somit handelsübliche Infrarotthermometer ebenso gut wie aufwändige Transpondersysteme zur Temperaturerfassung geeignet sind<sup>99</sup>.

Gerade vor dem Hintergrund jüngster technologischer Entwicklungen und der zunehmenden Beliebtheit von Systemen wie Telemetrie-, Video- und automatisierten Heimkäfigsystemen bietet maschinelles Lernen (ML) vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, um die Qualität von Abbruchkriterien zu verbessern. ML könnte dafür genutzt werden, um Abbruchkriterien anhand kontinuierlich erhobener physiologischer Parameter wie beispielsweise der Körpertemperatur und von Verhaltensparametern wie der lokomotorischen Aktivität vorherzusagen. Darüber hinaus ließen sich auch Parameterkombinationen, nicht lineare Zusammenhänge und komplexe Datensätze die aus verschiedenen Quellen wie beispielsweise Telemetrie- und Videoaufnahmen gespeist werden, untersuchen, welche der Analyse anhand klassischer statistischer Modelle nicht zugänglich sind<sup>100</sup>.

Trotz der vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten ist ML keine Panazee. Eine wesentliche Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz überwachter Lernmodelle ist die Verfügbarkeit annotierter Datensätze, d.h. von Trainingsdaten, die in Bezug auf das Auftreten von Abbruchkriterien durch einen menschlichen Untersucher annotiert wurden, wodurch zusätzlicher Arbeitsaufwand entsteht<sup>63</sup>. Eine weitere Voraussetzung ist die Verfügbarkeit ausreichend großer Datensätze, denn sind die Trainingsdaten nicht repräsentativ für das jeweilige Tiermodell, ist die Fehleranfälligkeit hoch<sup>63,100</sup>. Abhilfe schaffen könnte beispielsweise die Verwendung offener Datenrepositorien („open data repositories“), um physiologische Parameter und Verhaltensdaten tierexperimenteller Studien zu bündeln und für die Programmierung und das Training von ML Modellen zur Verfügung zu stellen. Andererseits können Validierungsverfahren, d. h. die Evaluation eines ML Modells anhand eines Testdatensatz, dazu dienen, die Genauigkeit der Vorhersagemodelle zu erhöhen<sup>61,63,100</sup>.

Zusammenfassend konnten wir erstmalig zeigen, dass ML dazu geeignet ist, Abbruchkriterien mit hoher Genauigkeit und bereits zu einem frühen Zeitpunkt eines Experiments vorherzusagen, wodurch die Qualität einer tierexperimentellen Studie erhöht und unnötiges Tierleid vermieden werden kann. Darüber hinaus trägt die Verwendung eindeutig definierter Abbruchkriterien dazu bei, das Risiko für Verschleißbias zu reduzieren, wodurch die interne Validität einer Studie erhöht und die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Translation in die Klinik erhöht werden kann<sup>16</sup>. Sofern ein ML Modell zuvor mit ausreichend Daten trainiert wurde, ist für dessen Anwendung in der Praxis kein Expertenwissen erforderlich.

ML Modelle zur Vorhersage von Abbruchkriterien ließen sich, ähnlich wie Modelle zur Analyse histologischer oder radiologischer Bilddaten<sup>101-103</sup>, kostenfrei in Online-Bibliotheken zur Verfügung stellen, um tierexperimentell forschenden Kollegen die Vorhersage von Abbruchkriterien mit hoher Genauigkeit zu erlauben.

## 4. ZUSAMMENFASSUNG

Die dieser kumulativen Habilitationsschrift zugrundeliegenden Arbeiten hatten zum Ziel, neue Therapieansätze zur Behandlung eines Schlaganfalls und Methoden zur Verbesserung des Refinements von Tierversuchen experimentell zu untersuchen.

Wir konnten erstmalig zeigen, dass i) Zelltod durch Phagozytose, d. h. der durch Phagozytose lebensfähiger Neurone induzierte Zelltod, ein relevanter Schädigungsmechanismus im ischämischen Hirngewebe ist und die Hemmung der Phagozytoseaktivität das funktionelle und histologische Outcome nach einer fokalen cerebralen Ischämie im Maus- bzw. Rattenmodell verbesserte; ii) eine fokale cerebrale Ischämie mit rascher Reperfusion zum selektiven neuronalen Zellverlust (SNL) im sonst intakten Hirngewebe und funktionellen Defiziten führte, welche durch die frühe normobare Oxygenierung (NBO) im Rattenmodell verhindert werden konnte; iii) maschinelles Lernen dazu geeignet war, Abbruchkriterien mit hoher Genauigkeit und bereits zu einem frühen Zeitpunkt eines Experiments vorherzusagen, wodurch die Qualität einer tierexperimentellen Studie erhöht und unnötiges Tierleid vermieden werden kann.

Die Hemmung der Phagozytoseaktivität zur Behandlung eines Schlaganfalls ist gegenwärtig Gegenstand tierexperimenteller Untersuchungen in mehreren Laboren. Die frühe NBO Therapie wird zurzeit in zwei klinischen Schlaganfallstudien untersucht.

Zusammenfassend können die in dieser kumulativen Habilitationsschrift beschriebenen neuen therapeutische Ansätze und Methoden dazu dienen, das Überleben und das funktionelle Outcome von Schlaganfallpatienten zu verbessern und die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Translation neuer Therapieansätze aus der tierexperimentellen Forschung in die klinische Anwendung zu erhöhen.


## 5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Feigin, V. L. *et al.* Update on the global burden of ischemic and hemorrhagic stroke in 1990-2013: The GBD 2013 study. *Neuroepidemiology* (2015). doi:10.1159/000441085
2. Johnson, C. O. *et al.* Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* (2019). doi:10.1016/S1474-4422(19)30034-1
3. Lindsay, M. P. *et al.* World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2019. *Int. J. Stroke* **14**, 806–817 (2019).
4. Weber, R. *et al.* Distribution and evolution of acute interventional ischemic stroke treatment in Germany from 2010 to 2016. *Neurol. Res. Pract.* (2019). doi:10.1186/s42466-019-0010-8
5. Butcher, K. *et al.* Thrombolysis in the developing world: Is there a role for streptokinase? *International Journal of Stroke* (2013). doi:10.1111/j.1747-4949.2012.00923.x
6. Berkowitz, A. L. *et al.* Worldwide reported use of IV tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *International Journal of Stroke* (2014). doi:10.1111/ij.s.12205
7. Emberson, J. *et al.* Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: A meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* (2014). doi:10.1016/S0140-6736(14)60584-5
8. Baron, J. C. Protecting the ischaemic penumbra as an adjunct to thrombectomy for acute stroke. *Nature Reviews Neurology* (2018). doi:10.1038/s41582-018-0002-2
9. Dirnagl, U. & Endres, M. Found in Translation. *Stroke* **45**, 1510–1518 (2014).
10. Paul, S. & Candelario-Jalil, E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies. *Exp. Neurol.* **335**, 113518 (2021).
11. Campbell, B. C. V & Khatri, P. Stroke. *Lancet* **396**, 129–142 (2020).
12. O’Collins, V. E. *et al.* 1,026 Experimental treatments in acute stroke. *Ann. Neurol.* (2006). doi:10.1002/ana.20741
13. Schmidt-Pogoda, A. *et al.* Why Most Acute Stroke Studies Are Positive in Animals but Not in Patients: A Systematic Comparison of Preclinical, Early Phase, and Phase 3 Clinical Trials of Neuroprotective Agents. *Ann. Neurol.* **87**, 40–51 (2020).
14. Dirnagl, U. Thomas Willis Lecture: Is Translational Stroke Research Broken, and if So, How Can We Fix It? *Stroke* (2016). doi:10.1161/STROKEAHA.116.013244
15. Dirnagl, U. Bench to bedside: The quest for quality in experimental stroke research. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (2006). doi:10.1038/sj.jcbfm.9600298
16. Holman, C. *et al.* Where Have All the



- Rodents Gone? The Effects of Attrition in Experimental Research on Cancer and Stroke. *PLoS Biol.* (2016). doi:10.1371/journal.pbio.1002331
17. Mergenthaler, P. & Meisel, A. Do stroke models model stroke? *DMM Disease Models and Mechanisms* (2012). doi:10.1242/dmm.010033
  18. Yarborough, M. *et al.* The bench is closer to the bedside than we think: Uncovering the ethical ties between preclinical researchers in translational neuroscience and patients in clinical trials. *PLOS Biol.* **16**, e2006343 (2018).
  19. Kumar, V., Abbas, A. K. & Aster, J. C. The Central Nervous System. in *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease* 1392 (Elsevier, 2020).
  20. Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W. & Price, D. L. *Basic Neurochemistry. Basic Neurochemistry* (Elsevier, 2012). doi:10.1016/C2009-0-00066-X
  21. Astrup, J., Siesjö, B. K. & Symon, L. Thresholds in cerebral ischemia — the ischemic penumbra. *Stroke* (1981). doi:10.1161/01.STR.12.6.723
  22. Garcia, J. H., Lassen, N. A., Weiller, C., Sperling, B. & Nakagawara, J. Ischemic stroke and incomplete infarction. *Stroke* (1996). doi:10.1161/01.STR.27.4.761
  23. Baron, J.-C., Yamauchi, H., Fujioka, M. & Endres, M. Selective Neuronal Loss in Ischemic Stroke and Cerebrovascular Disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**, 2–18 (2014).
  24. Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M. & Brown, G. C. Neuronal Cell Death. *Physiol. Rev.* **98**, 813–880 (2018).
  25. Moskowitz, M. A., Lo, E. H. & Iadecola, C. The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. *Neuron* **67**, 181–198 (2010).
  26. Dirnagl, U. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1268**, 21–25 (2012).
  27. Campbell, B. C. V. *et al.* Ischaemic stroke. *Nat. Rev. Dis. Prim.* (2019). doi:10.1038/s41572-019-0118-8
  28. Degtrev, A. *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* (2005). doi:10.1038/nchembio711
  29. Nitatori, T. *et al.* Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J. Neurosci.* (1995). doi:10.1523/jneurosci.15-02-01001.1995
  30. Eliasson, M. J. L. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat. Med.* (1997). doi:10.1038/nm1097-1089
  31. Neher, J. J. *et al.* Inhibition of Microglial Phagocytosis Is Sufficient To Prevent Inflammatory Neuronal Death. *J. Immunol.* (2011). doi:10.4049/jimmunol.1003600
  32. Fricker, M. *et al.* MFG-E8 Mediates Primary Phagocytosis of Viable Neurons during Neuroinflammation. *J. Neurosci.* **32**, 2657–2666 (2012).
  33. Neumann, H., Kotter, M. R. & Franklin, R. J. M. Debris clearance by microglia: an

- essential link between degeneration and regeneration. *Brain* **132**, 288–295 (2008).
34. Ravichandran, K. S. “Recruitment Signals” from Apoptotic Cells. *Cell* **113**, 817–820 (2003).
  35. Tyurina, Y. Y. *et al.* Nitrosative Stress Inhibits the Aminophospholipid Translocase Resulting in Phosphatidylserine Externalization and Macrophage Engulfment. *J. Biol. Chem.* **282**, 8498–8509 (2007).
  36. Brown, G. C. & Neher, J. J. Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: ‘Phagoptosis’. *Trends in Biochemical Sciences* (2012). doi:10.1016/j.tibs.2012.05.002
  37. Neher, J. J. *et al.* Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E4098–E4107 (2013).
  38. A., G. Genistein attenuates neurological deficits induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Neurol. Sci.* **381**, 303 (2017).
  39. Grommes, C. *et al.* Regulation of microglial phagocytosis and inflammatory gene expression by Gas6 acting on the Axl/Mer family of tyrosine kinases. *J. NeuroImmune Pharmacol.* (2008). doi:10.1007/s11481-007-9090-2
  40. Mari, C. *et al.* 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* **31**, 733–739 (2004).
  41. Singhal, A. B., Dijkhuizen, R. M., Rosen, B. R. & Lo, E. H. Normobaric hyperoxia reduces MRI diffusion abnormalities and infarct size in experimental stroke. *Neurology* **58**, 945–952 (2002).
  42. Esposito, E., Mandeville, E. T., Hayakawa, K., Singhal, A. B. & Lo, E. H. Effects of normobaric oxygen on the progression of focal cerebral ischemia in rats. *Exp. Neurol.* **249**, 33–38 (2013).
  43. Shin, H. K. *et al.* Normobaric hyperoxia improves cerebral blood flow and oxygenation, and inhibits peri-infarct depolarizations in experimental focal ischaemia. *Brain* **130**, 1631–1642 (2007).
  44. Kim, H. Y., Singhal, A. B. & Lo, E. H. Normobaric hyperoxia extends the reperfusion window in focal cerebral ischemia. *Ann. Neurol.* (2005). doi:10.1002/ana.20430
  45. Beynon, C., Sun, L., Marti, H. H., Heiland, S. & Veltkamp, R. Delayed hyperbaric oxygenation is more effective than early prolonged normobaric hyperoxia in experimental focal cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* **425**, 141–145 (2007).
  46. Fujiwara, N. *et al.* Combination therapy with normobaric oxygen (NBO) plus thrombolysis in experimental ischemic stroke. *BMC Neurosci.* **10**, 79 (2009).
  47. Liang, J. *et al.* Normobaric Hyperoxia Slows Blood–Brain Barrier Damage and Expands the Therapeutic Time Window for Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment in Cerebral Ischemia. *Stroke* **46**, 1344–1351 (2015).
  48. Tiwari, Y. V. *et al.* Effects of stroke severity

- and treatment duration in normobaric hyperoxia treatment of ischemic stroke. *Brain Res.* **1635**, 121–129 (2016).
49. Ioannidis, J. P. A. Why Most Published Research Findings Are False. *PLoS Med.* **2**, e124 (2005).
  50. Bailoo, J. D., Reichlin, T. S. & Würbel, H. Refinement of experimental design and conduct in laboratory animal research. *ILAR J.* (2014). doi:10.1093/ilar/ilu037
  51. Hendriksen, C. F. M. & Morton, D. B. Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research. in *Proceedings of the International Conference, 22-25 November 1998, Zeist, the Netherlands* 150 (Royal Society of Medicine Press Ltd, 1999).
  52. Russell, W. M. S. & Burch, R. L. *The principles of humane experimental technique.* (Methuen & Co. Limited, 1959).
  53. Hooijmans, C. R., Leenaars, M. & Ritskes-Hoitinga, M. A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the three Rs, and to make systematic reviews more feasible. *ATLA Altern. to Lab. Anim.* (2010). doi:10.1177/026119291003800208
  54. Kilkeny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M. & Altman, D. G. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 1577–1579 (2010).
  55. Percie du Sert, N. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biol.* **18**, e3000410 (2020).
  56. Percie du Sert, N. *et al.* The IMPROVE Guidelines (Ischaemia Models: Procedural Refinements Of in Vivo Experiments). *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (2017). doi:10.1177/0271678X17709185
  57. Enserink, M. Sloppy reporting on animal studies proves hard to change. *Science* (2017). doi:10.1126/science.357.6358.1337
  58. Baker, D., Lidster, K., Sottomayor, A. & Amor, S. Two Years Later: Journals Are Not Yet Enforcing the ARRIVE Guidelines on Reporting Standards for Pre-Clinical Animal Studies. *PLoS Biol.* **12**, e1001756 (2014).
  59. Hair, K., Macleod, M. R. & Sena, E. S. A randomised controlled trial of an intervention to improve compliance with the ARRIVE guidelines (IICARus). *Res. Integr. Peer Rev.* **4**, 12 (2019).
  60. Herrmann, K. & Flecknell, P. The application of humane endpoints and humane killing methods in animal research proposals: A retrospective review. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* (2018). doi:10.1177/026119291804600606
  61. Mei, J. *et al.* Refining humane endpoints in mouse models of disease by systematic review and machine learning-based endpoint definition. *ALTEX* (2019). doi:10.14573/altex.1812231
  62. Samuel, A. L. Some Studies in Machine Learning Using the Game of Checkers. *IBM J. Res. Dev.* **3**, 210–229 (1959).
  63. Mohri, M., Rostamizadeh, A. & Talwalkar, A. *Foundations of Machine Learning.* 

- ?????? (The MIT Press, 2018).
64. Geuther, B. Q. *et al.* Robust mouse tracking in complex environments using neural networks. *Commun. Biol.* **2**, 124 (2019).
  65. Sturman, O. *et al.* Deep learning-based behavioral analysis reaches human accuracy and is capable of outperforming commercial solutions. *Neuropsychopharmacology* **45**, 1942–1952 (2020).
  66. Shenk, J., Lohkamp, K. J., Wiesmann, M. & Kiliaan, A. J. Automated Analysis of Stroke Mouse Trajectory Data With Traja. *Front. Neurosci.* (2020). doi:10.3389/fnins.2020.00518
  67. Warren, R. A. *et al.* A rapid whisker-based decision underlying skilled locomotion in mice. *Elife* **10**, (2021).
  68. Hong, W. *et al.* Automated measurement of mouse social behaviors using depth sensing, video tracking, and machine learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2015). doi:10.1073/pnas.1515982112
  69. Franco, N. H., Correia-Neves, M. & Olsson, I. A. S. How ‘humane’ is your endpoint?-refining the science-driven approach for termination of animal studies of chronic infection. *PLoS Pathog.* (2012). doi:10.1371/journal.ppat.1002399
  70. Newsom, D. M., Bolgos, G. L., Colby, L. & Nemzek, J. A. Comparison of body surface temperature measurement and conventional methods for measuring temperature in the mouse. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* **43**, 13–8 (2004).
  71. SHINOZAKI, T., DEANE, R. & PERKINS, F. M. Infrared tympanic thermometer: evaluation of a new clinical thermometer. *Crit. Care Med.* **16**, 148–150 (1988).
  72. Alawieh, A., Farris Langley, E. & Tomlinson, S. Targeted complement inhibition salvages stressed neurons and inhibits neuroinflammation after stroke in mice. *Sci. Transl. Med.* (2018). doi:10.1126/scitranslmed.aao6459
  73. Narang, A. *et al.* Natural IgM antibodies that bind neoepitopes exposed as a result of spinal cord injury , drive secondary injury by activating complement. *J. Neuroinflammation* **14**, 120 (2017).
  74. Crunkhorn, S. Opening the therapeutic window. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 467–467 (2018).
  75. Zhang, Y. *et al.* TMEM16F Aggravates Neuronal Loss by Mediating Microglial Phagocytosis of Neurons in a Rat Experimental Cerebral Ischemia and Reperfusion Model. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
  76. Yang, J. *et al.* Neuronal extracellular vesicle derived miR-98 prevents salvageable neurons from microglial phagocytosis in acute ischemic stroke. *Cell Death Dis.* **12**, 23 (2021).
  77. Schilling, M. *et al.* Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: An investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp. Neurol.* **196**, 290–297 (2005).
  78. Fu, R., Shen, Q., Xu, P., Luo, J. J. & Tang, Y. Phagocytosis of microglia in the central

- nervous system diseases. *Mol. Neurobiol.* (2014). doi:10.1007/s12035-013-8620-6
79. Koizumi, S. *et al.* UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* (2007). doi:10.1038/nature05704
80. Wen, R. X. *et al.* P2Y6 receptor inhibition aggravates ischemic brain injury by reducing microglial phagocytosis. *CNS Neurosci. Ther.* (2020). doi:10.1111/cns.13296
81. Woo, M. S. *et al.* Genetic deletion of CD36 enhances injury after acute neonatal stroke. *Ann. Neurol.* (2012). doi:10.1002/ana.23727
82. Kawabori, M. *et al.* Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) deficiency attenuates phagocytic activities of microglia and exacerbates ischemic damage in experimental stroke. *J. Neurosci.* (2015). doi:10.1523/JNEUROSCI.2620-14.2015
83. Stupp, R. *et al.* Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* (2010). doi:10.1200/JCO.2009.26.6650
84. Emmrich, J. V. *et al.* Stage 1 Registered Report: Effect of deficient phagocytosis on neuronal survival and neurological outcome after temporary middle cerebral artery occlusion (tMCAo). *F1000Research* (2017). doi:10.12688/f1000research.12537.1
85. Ejaz, S. *et al.* Normobaric hyperoxia markedly reduces brain damage and sensorimotor deficits following brief focal ischaemia. *Brain* **139**, 751–764 (2016).
86. Emmrich, J. V., Ejaz, S., Neher, J. J., Williamson, D. J. & Baron, J. C. Regional distribution of selective neuronal loss and microglial activation across the MCA territory after transient focal ischemia: Quantitative versus semiquantitative systematic immunohistochemical assessment. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (2015). doi:10.1038/jcbfm.2014.181
87. Ejaz, S., Emmrich, J. V., Sawiak, S. J., Williamson, D. J. & Baron, J. C. Cortical Selective Neuronal Loss, Impaired Behavior, and Normal Magnetic Resonance Imaging in a New Rat Model of True Transient Ischemic Attacks. *Stroke* **46**, 1084–1092 (2015).
88. Morris, R. S. *et al.* Relationships between selective neuronal loss and microglial activation after ischaemic stroke in man. *Brain* (2018). doi:10.1093/brain/awy121
89. Mazdeh, M., Taher, A., Torabian, S. & Seifirad, S. Effects of normobaric hyperoxia in severe acute stroke: A randomized controlled clinical trial study. *Acta Med. Iran.* **53**, 676–680 (2015).
90. Rønning, O. M. & Guldvog, B. Should stroke victims routinely receive supplemental oxygen? A quasi-randomized controlled trial. *Stroke* (1999). doi:10.1161/01.STR.30.10.2033
91. Padma, M. V. *et al.* Normobaric oxygen therapy in acute ischemic stroke: A pilot study in Indian patients. *Ann. Indian Acad.*

- Neurol.* (2010). doi:10.4103/0972-2327.74203
92. Singhal, A. B. *et al.* A pilot study of normobaric oxygen therapy in acute ischemic stroke. *Stroke* (2005). doi:10.1161/01.STR.0000158914.66827.2e
  93. Singhal, A. B. *et al.* Magnetic resonance spectroscopy study of oxygen therapy in ischemic stroke. *Stroke* (2007). doi:10.1161/STROKEAHA.107.487280
  94. González, R. G. *et al.* Stability of large diffusion/perfusion mismatch in anterior circulation strokes for 4 or more hours. *BMC Neurol.* **10**, 13 (2010).
  95. Roffe, C. *et al.* The SOS Pilot Study: A RCT of Routine Oxygen Supplementation Early after Acute Stroke—Effect on Recovery of Neurological Function at One Week. *PLoS One* **6**, e19113 (2011).
  96. Ali, K. *et al.* The Stroke Oxygen Pilot Study: A Randomized Controlled Trial of the Effects of Routine Oxygen Supplementation Early after Acute Stroke—Effect on Key Outcomes at Six Months. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0059274
  97. Roffe, C. *et al.* Effect of Routine Low-Dose Oxygen Supplementation on Death and Disability in Adults With Acute Stroke. *JAMA* **318**, 1125 (2017).
  98. Roffe, C. *et al.* Routine low-dose continuous or nocturnal oxygen for people with acute stroke: three-arm Stroke Oxygen Supplementation RCT. *Health Technol. Assess. (Rockv)*. **22**, 1–88 (2018).
  99. Mei, J. *et al.* Body temperature measurement in mice during acute illness: Implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. *Sci. Rep.* (2018). doi:10.1038/s41598-018-22020-6
  100. Valletta, J. J., Torney, C., Kings, M., Thornton, A. & Madden, J. Applications of machine learning in animal behaviour studies. *Animal Behaviour* (2017). doi:10.1016/j.anbehav.2016.12.005
  101. Montagnon, E. *et al.* Deep learning workflow in radiology: a primer. *Insights Imaging* **11**, 22 (2020).
  102. Rączkowski, Ł., Możejko, M., Zambonelli, J. & Szczurek, E. ARA: accurate, reliable and active histopathological image classification framework with Bayesian deep learning. *Sci. Rep.* **9**, 14347 (2019).
  103. Stritt, M., Stalder, A. K. & Vezzali, E. Orbit Image Analysis: An open-source whole slide image analysis tool. *PLoS Comput. Biol.* **16**, e1007313 (2020).

## 6. DANKSAGUNG

An dieser Stelle danke ich allen, die mir die Vollendung dieser kumulativen Habilitationsschrift ermöglichten.

Meinen Kolleginnen und Kollegen aus der Klinik für Neurologie und der Abteilung für Experimentelle Neurologie der Charité, den Abteilungen für Biochemie und für klinische Neurowissenschaften der Universität Cambridge und der Fachgruppe Versuchstierkunde am Bundesinstitut für Risikobewertung danke ich, dass sie mich an ihren Erfahrungen teilhaben ließen und für ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen der gemeinsamen Arbeiten beigetragen haben.

Ich danke Herrn Professor Dr. Ulrich Dirnagl, Herrn Professor Jean-Claude Baron, Herrn Dr. Jonas Neher, Herrn Professor Guy Brown und Frau Professor Dr. Claudia Spies für ihre wohlwollende Zusammenarbeit, kreative Diskussionen, hervorragende Betreuung, fachliche Expertise und Begleitung meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten in den vergangenen Jahren.

Vor allem danke ich Herrn Professor Dr. Matthias Endres für seine Unterstützung und vielseitige Förderung meiner eigenständigen wissenschaftlichen Entwicklung und sein Vertrauen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Ich danke den Verantwortlichen und Förderern des Junior Clinician Scientist und des Digital Clinician Scientist Programms des Berlin Institute of Health für die wertvolle mir gewährte geschützte Forschungszeit und Frau Professor Duska Dragun, die das Programm initiiert und geleitet und die mich stets wohlwollend und vorbehaltlos gefördert hat. Diese Arbeit ist ihrem Andenken gewidmet.

## 7. ERKLÄRUNG nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, den 30.03.2021