

Aus dem Institut für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neuroprotektion durch den PPAR δ -Agonisten SAR145 in einem
murinen Modell des ischämischen Schlaganfalls

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Samuel Knauss

aus Heidelberg

Datum der Promotion: 25.06.2017

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	IV
Abstract	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 Der ischämische Schlaganfall	2
1.1.1 Aktuelle Therapie des ischämischen Schlaganfalls	3
1.1.2 Die ischämische Kaskade	4
1.1.2.1 Schädigende Prozesse	5
1.1.3 Ischämische Toleranz und neuroprotektive Therapien	6
1.2 Die Gruppe der <i>peroxisome proliferator-activated</i> Rezeptoren als mögliche Zielstruktur einer neuroprotektiven Therapie	7
1.2.1 Der Subtyp PPAR δ	10
1.2.2 Einfluss von PPAR δ auf die Neuroinflammation	12
1.2.2.1 Einfluss von PPAR δ auf Zytokine, Chemokine und Transkriptionsfaktoren	13
1.2.2.2 Einfluss von PPAR δ auf das vaskuläre Kompartiment	15
1.2.2.3 Einfluss von PPAR δ auf die Aktivierung der Mikroglia	16
1.2.3 Bisherige Ergebnisse zur Rolle von PPAR δ im Schlaganfallmodell	17
1.3 Zielsetzung	18
1.3.1 Fragestellungen und Hypothesen	19
1.3.1.1 Fragestellungen und Hypothesen zur Testung von SAR145 <i>in vivo</i>	19
1.3.1.2 Fragestellungen und Hypothesen zur Testung von SAR145 <i>in vitro</i>	21
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Material	22
2.1.1 Puffer und Medien	22
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Antikörper	23
2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.1.5 Software	25
2.1.6 Zelllinien	26
2.1.7 Versuchstiere und Haltung	26
2.1.8 PPAR δ -Agonist SAR145	27

2.2	Methoden	27
2.2.1	Tierexperimentelle Methoden	27
2.2.1.1	<i>Randomisierung und Verblindung</i>	28
2.2.1.2	<i>Ein- und Ausschlusskriterien</i>	28
2.2.1.3	<i>Präparation und Applikation des Liganden</i>	29
2.2.1.4	<i>Bestimmung der Konzentration von SAR145 im Zielgewebe</i>	29
2.2.1.5	<i>Mausmodell des ischämischen Schlaganfalls</i>	30
2.2.1.6	<i>Postoperative Versorgung der Versuchstiere und Abbruchkriterien</i>	32
2.2.1.7	<i>Laser-Doppler-Flussmessung</i>	33
2.2.1.8	<i>Verhaltensanalysen</i>	33
2.2.1.9	<i>Schlaganfallvolumetrie</i>	36
2.2.2	Zellbiologische Methoden	41
2.2.2.1	<i>Isolierung von primären Mikrogliazellen</i>	41
2.2.2.2	<i>Messung der Inhibition der Mikrogliaaktivierung</i>	42
2.2.2.3	<i>Untersuchung der TNFα-induzierten ICAM-1-Expression auf bEnd.3 Zellen</i>	43
2.3	Statistik	45
3.	<u>ERGEBNISTEIL</u>	46
3.1	Laser-Doppler-Flussmessung bei MCAo	47
3.2	Konzentration von SAR145 in Hirngewebe nach oraler Gabe	47
3.3	Charakterisierung des neuroprotektiven Effekts von SAR145 bei Wildtyp-Tieren	47
3.3.1	Dosisabhängige Wirkung von SAR145	47
3.3.2	Abhängigkeit der Wirkung von SAR145 vom Zeitpunkt der ersten Gabe	49
3.4	Untersuchung der PPARδ-spezifischen neuroprotektiven Wirkung von SAR145 an PPARδ-Knock-out-Tieren	50
3.5	Charakterisierung des funktionellen und morphologischen Endergebnisses im subakuten Stadium nach fokaler zerebraler Ischämie	53
3.5.1	RotaRod	55
3.5.2	Corner Test	55
3.5.3	Pole Test	56
3.5.4	CatWalk	57
3.5.5	Auswertung der MRT-gestützten Infarkt-volumetrie im subakuten Stadium	60
3.6	Wirkung von SAR145 auf Mikroglia und Endothelzellkulturen	60
3.6.1	Verringerung der Mikrogliaaktivierung durch SAR145	60
3.6.2	Verringerung der ICAM-1-Expression auf bEnd.3 Zellen	61

4. DISKUSSION	64
4.1 Diskussion und Interpretation der eigenen Ergebnisse	64
4.1.1 Ziel der Studie - hypothesenbestätigend oder hypothesengenerierend?	65
4.1.2 Wirkung von SAR145 am Zielort	66
4.1.3 Einfluss von PPAR δ auf die Infarktgröße	67
4.1.3.1 <i>Dosis-Wirkungs-Kurve und Zeitfensterstudie</i>	67
4.1.3.2 <i>PPARδ-Knock-out</i>	71
4.1.4 Einfluss von PPAR δ -Agonisten auf das funktionelle und morphologische Endergebnis	72
4.1.5 Einfluss von SAR145 auf Marker der Inflammation	76
4.1.6 Zusammenfassende Interpretation der eigenen Ergebnisse	77
4.2 Diskrepanz zu Ergebnissen bisher veröffentlichter Studien	78
4.2.1 Systematische Recherche und Bewertung der Studienqualität bisher publizierter Arbeiten	78
4.2.2 Einfluss der Studienqualität auf Effektgröße und Replizierbarkeit	80
4.2.2.1 <i>Der Positive Prädiktive Wert und mögliche Einflussfaktoren</i>	80
4.3 Hindernisse in der translationalen Forschung	82
4.3.1 Die translationale Kaskade	83
Literaturverzeichnis	85
Abkürzungsverzeichnis	104
Abbildungsverzeichnis	107
Tabellenverzeichnis	107
Eidesstattliche Versicherung	108
Lebenslauf	109
Danksagung	110

Kurzfassung

Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie des Schlaganfalls hat die Modulation der postischämischen Inflammation als Ansatzpunkt für eine neuroprotektive Therapie nach zerebralen ischämischen Ereignissen in den Fokus gerückt. Berichte über die antiinflammatorischen Eigenschaften der *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)-Familie mit den Subtypen α , γ und δ gaben Anlass zur Hoffnung, dass Agonisten dieser Rezeptoren neuroprotektive Eigenschaften besitzen. Agonisten des im Gehirn prädominanten Rezeptorsubtyps PPAR δ waren jedoch lange Zeit nicht verfügbar. Erst in den letzten Jahren wurde die neuroprotektive Wirksamkeit einer intrathekalen Vorbehandlung mit PPAR δ -Agonisten untersucht.

In in-vivo- und in-vitro-Modellen des ischämischen Schlaganfalls wurde in der vorliegenden Arbeit nun erstmals der neuartige PPAR δ -Agonist SAR145 untersucht, der auch bei oraler Gabe eine hohe zerebrale Bioverfügbarkeit zeigt. Im transienten proximalen *middle cerebral artery occlusion* (MCAo)-Modell des ischämischen Schlaganfalls wurden dazu an C57Bl/6 Mäusen in Übereinstimmung mit den Empfehlungen des Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) im ersten Schritt die wirksamste Dosis und das effektive Zeitfenster für die Behandlung mit SAR145 bestimmt.

Um eine nicht PPAR δ -spezifische neuroprotektive Wirkung von SAR145 auszuschließen, wurde die effektivste Dosis/Behandlungszeitpunktkombination zudem an PPAR δ -Knock-out (KO)-Tieren getestet. Im letzten Schritt wurde mit einer Verhaltenstestbatterie der Einfluss von SAR145 auf das funktionelle Defizit nach MCAo über einen Zeitraum von 28 Tagen analysiert. Zusätzlich wurde der Effekt von SAR145 auf die Aktivierung von Mikroglia und Endothelzellen durch inflammatorische Stimuli in vitro untersucht.

In drei unabhängigen Gruppen führte die Behandlung mit 10 mg SAR145 pro Kilogramm (kg) Körpergewicht (KG) zum Zeitpunkt der Reperfusion im Mittel zu einer Reduktion der Infarktgröße um 18 ± 10 % im Vergleich zu den Vehikelgruppen. Dieser Effekt war jedoch in keiner der Subgruppen statistisch signifikant. PPAR δ -Knock-out-Tiere zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine signifikant höhere Mortalität nach MCAo. Tiere der Knock-out-Verumgruppe zeigten im Vergleich zu Tieren der Knock-out-Vehikelgruppe im Mittel keine kleineren Infarkte. In der Analyse des funktionellen Endergebnisses zeigte sich keine signifikante Neuroprotektion durch eine Behandlung mit SAR145.

In vitro kam es bei Behandlung mit SAR145 zu einer signifikanten Reduktion der Aktivierung von Mikroglia und Endothelzellen durch einen inflammatorischen Stimulus.

Insgesamt zeichnete sich das Bild einer allenfalls moderaten neuroprotektiven Wirkung von SAR145, die jedoch mit den verwendeten Methoden in vivo nicht zu belegen war. Die vorliegende Arbeit steht damit im Widerspruch zu bisherigen Publikationen, die eine deutliche Neuroprotektion durch eine Behandlung mit PPAR δ -Agonisten berichteten. Neben Unterschieden im experimentellen Design und den verwendeten Substanzen könnten auch Unterschiede in der Studienqualität, das sogenannte Proteus-Phänomen und *publication bias* zu einer scheinbaren Vergrößerung der bisher berichteten Effektgrößen beigetragen haben. Aufgrund der geringen Anzahl bisher veröffentlichter Studien zu PPAR δ -Agonisten in Modellen des ischämischen Schlaganfalls lässt sich dies jedoch mit den bislang zur Verfügung stehenden statistischen Methoden nicht eindeutig belegen.

Abstract

Better understanding of the pathophysiology of ischemic stroke led to the insight that neuronal injury after stroke progresses for days to weeks after onset of symptoms. One of the key players in this process is an ischemia induced inflammatory reaction in the affected area. Reports about the important role of the nuclear Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR)-family in regulating inflammatory signaling fostered hope to use PPAR agonists as a neuroprotective therapy even in a wider time window. The PPAR-family consists of the subtypes α , γ and δ , with subtype δ being the most abundant one in the brain. PPAR δ agonists however have only become available rather recently. As yet there is little knowledge about the neuroprotective potency of pharmacological PPAR δ activation after an ischemic event.

We tested the novel orally administered PPAR δ agonist SAR145 in the in vivo transient proximal middle cerebral artery occlusion (MCAo) filament model of ischemic stroke and the effect of SAR145 treatment on microglial and endothelial activation in vitro. In accordance with the stroke academic industry roundtable (STAIR) recommendations we first established the most effective dose and time point after reperfusion in C57Bl/6 mice using histological papanicolaou staining to determine infarct sizes. To rule out non-specific neuroprotective effects we then used PPAR δ knockout mice to test the neuroprotective potency of SAR145 in the absence of PPAR δ . The effect of SAR145 on the functional longer-term outcome was further evaluated using a battery of behavioural tests up to four weeks after MCAo.

Three independent groups treated with 10 mg/kg bodyweight SAR145 directly after reperfusion showed a consistent mean reduction in infarct size of $18 \pm 10\%$ compared to vehicle treated groups. However, in rigorous statistical testing these effects were not significant. PPAR δ knockout mice showed a significantly higher mortality after MCAo and there was no reduction in infarct size observed in the verum treated knockout group. The assessment of functional longer-term outcome yielded no significant neuroprotection by SAR145 treatment. In vitro activation of microglia and endothelial cells by an inflammatory stimulus was significantly reduced by treatment with SAR145.

In this study we could not confirm prior reports of strong neuroprotection yielded by treatment with PPAR δ agonists. This could be due to differences in the experimental design or the used substances but may also be explained by differences in study quality, the “proteus phenomenon” or publication bias. However, as to date only very few studies on PPAR δ agonists in models of cerebral ischemia are available, the influence of these factors could not yet be statistically proven.

1. Einleitung

Seit Beginn der statistischen Aufzeichnungen in Deutschland durch das „Kaiserliche Statistische Amt“ zeichnet sich ein stetiger Anstieg der Lebenserwartung ab.¹ Machten im Jahr 2008 die über 65-Jährigen 20 % der Gesamtbevölkerung aus, so werden es im Jahr 2060 bereits 37 % sein. Dabei wird in Zukunft vor allem die Zahl der Hochbetagten wachsen. Bis zum Jahr 2050 wird sich die Zahl der über 80-Jährigen mehr als verdoppeln.² Weltweit stellt der Schlaganfall die zweithäufigste Todesursache und die häufigste vermeidbare Ursache von Behinderung dar.³ Im Jahr 2010 lebten weltweit 33 Millionen Menschen, die einen oder mehrere Schlaganfälle erlitten hatten. Es wird prognostiziert, dass diese Zahl aufgrund der demografischen Entwicklung bis 2030 auf 70 Millionen ansteigen wird.³ Obwohl in den Jahren 1990-2010 bereits ein Rückgang der durch Schlaganfall bedingten Mortalität und Morbidität erreicht werden konnte, fiel dieser gerade in der Gruppe der über 65-Jährigen gering aus.⁴ Somit ist in den kommenden Jahren mit einem starken Anstieg des durch einen Schlaganfall verursachten Leidens und der Kosten für die Gesellschaft zu erwarten.⁴⁻⁶ Schon im Jahr 2011 beliefen sich die direkten und indirekten Kosten des Schlaganfalls in den USA auf 33,6 Milliarden USD⁴ bzw. über 38 Milliarden EUR in der Europäischen Union im Jahr 2009.⁷

Der beobachtete Rückgang der Schlaganfallmortalität wird auf eine deutlich verbesserte und spezifischere Versorgung von Schlaganfallpatienten zurückgeführt.³ Grundlage für die bessere Versorgung sind die in den letzten Jahrzehnten gewonnenen Erkenntnisse über die Pathophysiologie und die Behandlungsmöglichkeiten des Schlaganfalls. Deshalb sind weitere intensive Forschungsbemühungen auf diesem Gebiet sinnvoll und dringend notwendig.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die neuroprotektive Wirkung der Aktivierung des nukleären Rezeptors *peroxisome proliferator-activated receptor δ* (PPAR δ) als Therapieansatz zur Behandlung des ischämischen Schlaganfalls zu untersuchen. Berichte über den Einfluss einer PPAR δ -Aktivierung auf die postischämische Inflammation ließen hoffen, mit PPAR δ -Agonisten auch noch in einem größeren Zeitfenster nach einem Schlaganfall eine effektive Neuroprotektion erreichen zu können (siehe 1.2, S. 7). Auch wenn bisher publizierte Arbeiten einen deutlichen neuroprotektiven Effekt zeigten, konnte mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden (siehe 2.2, S. 22) weder histomorphologisch (siehe 3.3, S. 47 und 3.4, S. 50) noch in funktionellen Analysen (siehe 3.5, S. 53) eine Neuroprotektion durch PPAR δ -Aktivierung eindeutig nachgewiesen werden. Die Gründe für diese Diskrepanz und inwieweit diese in der

eigenen Arbeit (siehe 4.1, S. 64) und auch in der Durchführung bisher publizierter Arbeiten (siehe 4.2.1, S. 78 und 4.2.2, S. 80) begründet liegt, soll diskutiert werden.

1.1 Der ischämische Schlaganfall

Der wahrscheinlich 1689 durch William Cole eingeführte Begriff „stroke“ (Schlaganfall)⁸ beschreibt ein Krankheitsbild, dessen Definition sich seit der ersten Beschreibung durch Hippokrates als „apoplexia“ immer wieder verändert hat. Die aktuell vorgesehene Definition für die ICD-11 unterteilt „Stroke“ in vier Subklassifikationen: Den zerebral ischämischen Schlaganfall, die intrazerebrale Blutung, die Subarachnoidalblutung und einen Schlaganfall ohne gesicherte ischämische oder hämorrhagische Ätiologie. Der ischämische Schlaganfall stellt dabei weltweit mit 68 %⁵ der Fälle und 87 % der Fälle in den USA⁴ die größte Subgruppe dar.

Bei einem ischämischen Schlaganfall kommt es aufgrund eines vorübergehenden oder dauerhaften Flusshindernisses in einem gehirnversorgenden Gefäß zu einer Minderperfusion des abhängigen Gewebes und folgendem Zellschaden und Zelltod. Die pathophysiologischen Prozesse, die ausgehend von einem initialen Sauerstoff- und Energiedefizit zum nachfolgenden Gewebeuntergang führen, laufen nach einem zeitlich und räumlich differenzierten Muster ab. Dabei muss zwischen mindestens drei Gebieten unterschieden werden. Im Gewebe, das den Kern des Infarktes bildet, ist der zerebrale Blutfluss auf unter 12 ml/100 g/min⁹ abgefallen. Durch das entstehende Energiedefizit und den Zusammenbruch der Ionenhomöostase kommt es binnen Minuten zum Zelltod durch Lipolyse, Proteolyse und damit zum Verlust der Membranintegrität.^{10,11} Im Gebiet der Infarktperipherie herrscht eine Oligämie bei einem zerebralen Blutfluss zwischen 20 und 50 ml/100 g/min.⁹ Durch kompensatorische Mechanismen, wie einer Steigerung des lokalen Blutvolumens (*pooling*) und der Maximierung der Sauerstoffextraktionsfraktion, kann in diesem Gebiet die Energieversorgung aufrechterhalten werden. Dazwischen liegt das im Jahr 1981 von Astrup erstmals beschriebene Gebiet der Penumbra.¹² Der Blutfluss ist dort unter die kritische Marke von 20 ml/100 g/min gefallen,⁹ sodass auch durch kompensatorische Mechanismen keine ausreichende Versorgung mehr gewährleistet werden kann. Dadurch kommt es zu einer Einschränkung der Funktion dieses Gewebes bei gleichzeitig noch erhaltenem Strukturstoffwechsel. Bleibt eine schnelle Reperfusion jedoch aus, wächst der Kern des Infarktgebietes, da weitere Teile der Penumbra unwiederbringlich zugrunde gehen.¹³ Den Untergang dieses Gewebes aufzuhalten ist das Hauptziel der spezifischen Schlaganfalltherapie.

1.1.1 Aktuelle Therapie des ischämischen Schlaganfalls

Trotz langjähriger Forschung steht in Europa und den USA nur eine einzige zugelassene spezifische medikamentöse Therapie des akuten Schlaganfalls zur Verfügung. Diese besteht in der Behandlung mit gewebespezifischem Plasminogenaktivator (t-PA). Seit der Zulassung durch die *Food and Drug Administration* (FDA) 1996 wurde der Nutzen dieser Behandlung, die auf die Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes ausgerichtet ist, in zahlreichen Studien belegt.¹⁴ Der Nutzen oder die Überlegenheit alternativer Wirkstoffe mit ähnlichem Wirkmechanismus, wie Desmoteplase oder Tenecteplase ist weiterhin nicht abschließend geklärt.¹⁵⁻¹⁷ Grund für die Suche nach alternativen Wirkstoffen sind u.a. ein limitierendes Sicherheitsprofil von t-PA und zahlreiche Kontraindikationen,^{18,19} weshalb nur ein kleiner Anteil der Schlaganfallpatienten mit t-PA behandelt werden kann.^{20,21} Ein wichtiger limitierender Faktor für die Therapie mit t-PA ist die starke Abhängigkeit der Wirkung vom Zeitpunkt der ersten Gabe.^{21,22} So ist die Gabe nur bis 4,5 Stunden (h) nach Auftreten der ersten Symptome zugelassen und auch innerhalb dieses Zeitfensters ist eine frühere Behandlung mit einem verbesserten Endergebnis (gemessen durch die *modified rankin scale*) verbunden.^{23,24} Für eine umschriebene Patientengruppe mit nachweisbarem Verschluss der Carotis interna oder der proximalen Arteria cerebri media stellen zudem endovaskuläre rekanalisierende Verfahren innerhalb eines engen Zeitfenster nach dem Ereignis eine weitere evidenzbasierte Behandlungsoption dar.²⁵⁻²⁸ Ähnlich erfolgreich wie eine t-PA-Therapie ist die Behandlung auf einer spezialisierten *Stroke Unit*,^{29,30} die spezifische an die angenommene Ätiologie des Schlaganfalls angepasste Sekundärprävention und eine Kontrolle der bekannten Risikofaktoren, wie arterieller Hypertonus, Diabetes oder eine Hypercholesterinämie bestmöglich gewährleistet.³¹⁻³³

Nur in Japan ist eine weitere spezifische medikamentöse Therapie des akuten Schlaganfalls zugelassen. Der Wirkstoff Edaravone ist ein Radikalfänger und soll bei einer Gabe innerhalb von 72 h den im Zuge der Ischämie auftretenden oxidativen Stress vermindern können.^{34,35} Der Nutzen eines weiteren Radikalfängers NXY-059 konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.³⁶ Beide Medikamente sollen in die nach einem ischämischen Ereignis ablaufende *ischämische Kaskade* eingreifen, um den Untergang weiteren Gewebes aufzuhalten, und auch eine Therapie außerhalb des engen Zeitfensters von 4,5 h ermöglichen.

1.1.2 Die ischämische Kaskade

Das in den letzten Jahrzehnten gewonnene Wissen um die pathophysiologischen Vorgänge nach einem ischämischen Ereignis hat zur Untersuchung zahlreicher Substanzen mit unterschiedlichsten Wirkmechanismen geführt.³⁷ Die Grundzüge dieser Vorgänge, der ischämischen Kaskade, sollen deshalb kurz dargestellt werden.

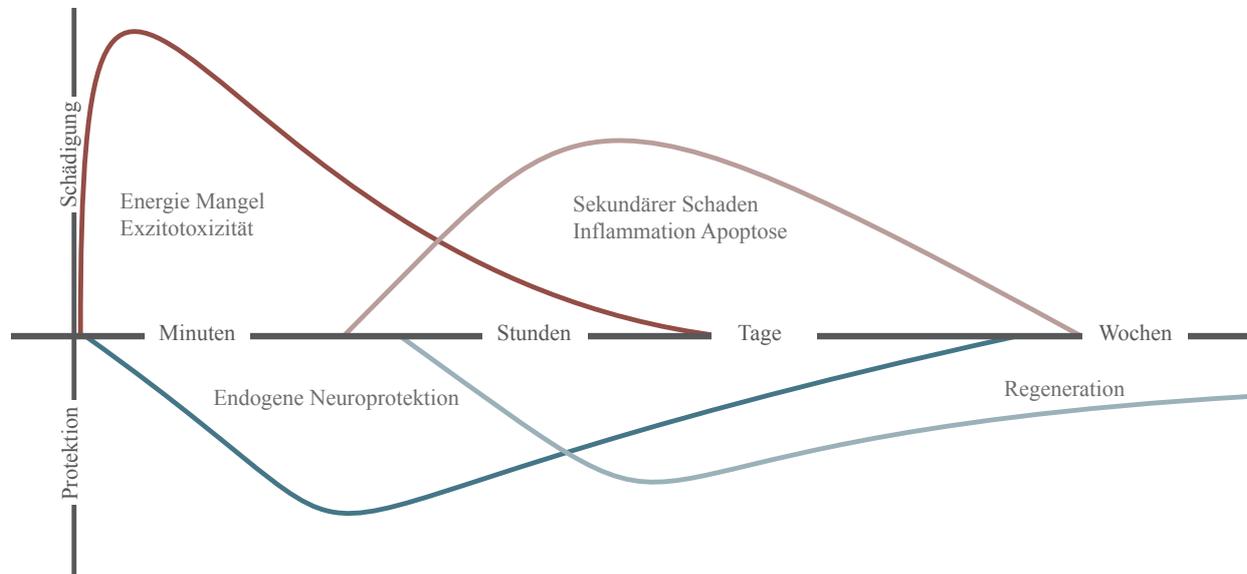


Abb. 1.1: Vereinfachte Darstellung der nach einem Schlaganfall ablaufenden Prozesse

Durch das Missverhältnis von Bedarf und Angebot an Sauerstoff und Energieträgern im vom Schlaganfall betroffenen Bereich des Gehirns werden dort, aber auch über dieses Gebiet hinaus, sowohl destruktive als auch protektive Mechanismen in Gang gesetzt. Das Verhältnis entscheidet letztendlich über das Ausmaß des Schadens. Modifiziert nach³⁸.

Die ischämische Kaskade ist als komplexe Interaktion zwischen beinahe allen im Gehirn vorkommenden Zelltypen zu verstehen.³⁹ Die neurovaskuläre Einheit (*neurovascular unit*), die Neuronen, Gliazellen, sowie Zellen und Strukturen der Gefäße beschreibt, kann als Schauplatz dieser Interaktion verstanden werden.⁴⁰

Die destruktiven Prozesse können grob in eine frühe, primäre und eine später auftretende sekundäre Schädigung unterteilt werden (siehe Abb. 1.1, S. 4), wobei es eine starke Überlappung dieser beiden Phasen gibt, die zum Teil auch voneinander abhängig sind und sich gegenseitig verstärken.^{38,41}

Insbesondere die Modulation der endogenen Neuroprotektion und die Verhinderung von sekundären Schäden durch Apoptose und Inflammation bieten sich als therapeutische Ziele an, da so das Zeitfenster für eine wirksame Therapie auf mehrere Stunden oder sogar Tage nach dem ischämischen Ereignis ausgedehnt werden könnte.

1.1.2.1 Schädigende Prozesse

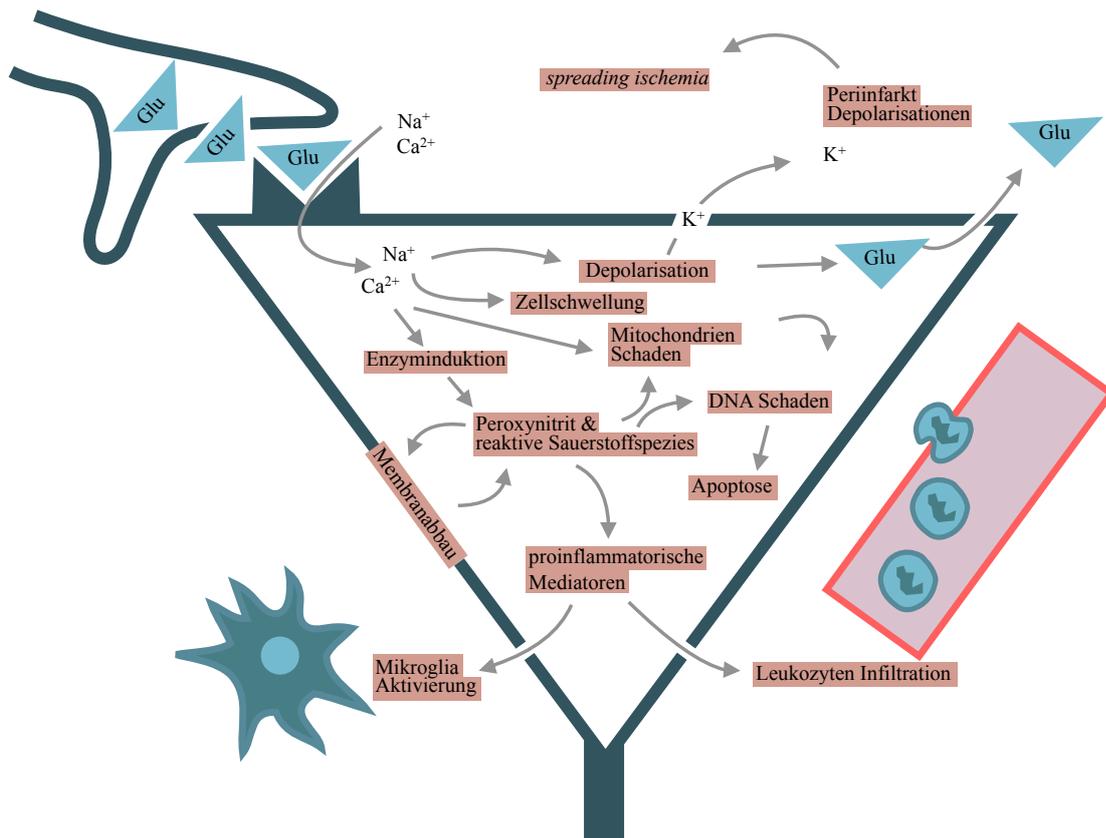


Abb. 1.2: Stark vereinfachte Darstellung der ischämischen Kaskade

Durch das Defizit an Sauerstoff (O₂) und Glukose im Infarktgebiet kommt es durch den Ausfall der Ionenpumpen zum Kalzium (Ca²⁺) Einstrom und Depolarisation. Die folgende Freisetzung v.a. exzitatorischer Neurotransmitter und Peptide führt über die Aktivierung von *N-Methyl-D-Aspartat* (NMDA)- und *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA)-Rezeptoren zu einem weiteren Einstrom von Ca²⁺ und Natrium (Na⁺) Ionen. Die Aktivierung von Phospholipasen, Proteasen und die Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (z. B. Peroxynitrit) durch die gestiegene Ca²⁺-Konzentration, sowie das durch den massiven Na⁺ ausgelöste *zytotoxisches Ödem* führen im Infarktkern zum Zelltod.⁴² In den angrenzenden Bereichen können die Zellen jedoch unter hohem Energieaufwand repolarisieren. Aufgrund der folgenden hohen Konzentration an exzitatorischen Neurotransmittern und Kaliumionen kommt es dort zu in Wellen auftretenden sogenannten *periinfarkt Depolarisationen*,⁴³⁻⁴⁵ die zu weiterem Zelluntergang und der Ausweitung des Infarktkerns führen.^{43,45} Periinfarkt Depolarisationen führen bei verminderter Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) zu *spreading ischemia*, einer weiteren Konstriktion der Gefäße.^{46,47} NO hat somit abhängig vom produzierenden Isoenzym, dem Zeitpunkt und dem Ort der Produktion sowohl schädigende⁴⁸ als auch protektive Wirkungen.¹⁰ NO ist zudem an der Aktivierung von Immunzellen und als stark zytotoxisches Peroxynitrit an Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schädigung und Apoptoseinduktion beteiligt. Abbildung Modifiziert nach¹⁰.

Schädigung durch Inflammation

Die Aktivierung von Immunzellen durch das ischämische Ereignis und ihre darauf folgende Invasion in das Parenchym führt zu einem selbstverstärkenden Prozess über die Ausschüttung

Einleitung

proinflammatorischer Mediatoren und trägt auch direkt zum Zelltod bei (siehe auch 1.2.2.1, S. 13). Dabei sind vier Hauptmechanismen zu nennen⁴⁹:

1. Die oben bereits erwähnte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch die *inducible nitric oxide* synthase (iNOS) wird erheblich gesteigert und führt in Kombination mit der Produktion von O_2^- zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und Peroxynitrit und zu oxidativem Zellschaden.
2. Komponenten des Komplementsystems werden in Gliazellen und Neuronen vermehrt gebildet, treten durch die durchlässige Blut-Hirn-Schranke verstärkt aus den Gefäßen aus und werden im Infarktareal aktiviert. Aktiviertes Komplement führt über die Bildung des Membran-Angriff-Komplexes zum Zelltod.
3. Die Interaktion des *first apoptosis signals* (Fas) (entspricht *cluster of differentiation* (CD)95) auf Neuronen und Glia mit dem Fas-Liganden (CD95L) auf Mikroglia und nicht hirneigene Immunzellen induziert in Neuronen und Gliazellen Apoptose.⁵⁰
4. Zytotoxische T-Zellen und natürliche Killer (NK)-Zellen schütten Perforin und Granzym aus, welche von den Zielzellen internalisiert werden und Apoptose induzieren.

Diese Prozesse zu regulieren und damit den Untergang weiterer Neurone zu verhindern, ist das Ziel mehrerer Therapieansätze zu Neuroprotektion.

1.1.3 Ischämische Toleranz und neuroprotektive Therapien

Die von Janoff eingeführten Begriffe „Präkonditionierung“ und „Toleranz“⁵¹ beschreiben das schon von Hippocrates erkannte Prinzip, dass ein potentiell schädigender Stimulus von geringerer Intensität eine Reaktion des Organismus hervorruft, die gegenüber einem nachfolgenden Stimulus stärkerer Intensität einen gewissen Schutz gewährt (*Similia similibus curentur*). Im Falle der zerebralen Ischämie spricht man von der ischämischen Präkonditionierung bzw. ischämischen Toleranz.⁴¹

Es besteht die Hoffnung, sich natürliche Mechanismen der Neuroprotektion in der klinischen Anwendung zunutze machen zu können. Von besonderem Interesse für die Schlaganfalltherapie sind Ansätze die sowohl an mehreren Punkten der Kaskade angreifen, als auch noch in einem späteren Zeitfenster wirksam sind. Ein Beispiel dafür ist die durch Hypoxie ausgelöste Regulation von Erythropoetin (Epo). Tatsächlich wiesen Studien in zahlreichen Modellen des ischämischen Schlaganfalls und der zerebralen Hypoxie auf eine neuroprotektive Wirkung hin.⁵² Dabei spielen für die Effekte einer ischämischen Präkonditionierung wahrscheinlich die intrazerebrale Produktion in Astrozyten und eine parakrine Wirkung die größte Rolle.⁵³

Allerdings konnten klinische Studien bisher keinen eindeutigen Nutzen einer Behandlung mit Epo nach einem Schlaganfall belegen.^{54,55} Dennoch gilt Epo weiterhin als vielversprechende Substanz, da es neben antiapoptotischen auch antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften aufweist. Die Rolle der Inflammation nach einem ischämischen Ereignis ist in den letzten Jahrzehnten zunehmend in den Fokus gerückt. Zum einen scheint die Entzündungsreaktion in der subakuten Phase einen destruktiven Effekt zu haben, zum anderen ist sie notwendig für die nachfolgenden regenerativen und reparativen Prozesse. Da die Modulation der Entzündungsreaktion gerade für eine Behandlung im akuten und subakuten Stadium einen vielversprechenden Ansatzpunkt darstellt, wurden zahlreiche therapeutische Ansätze getestet, die jedoch bisher keinen Erfolg in klinischen Studien zeigten.

Die bislang unzureichende Kenntnis der genauen Vorgänge der postischämischen Inflammation könnte ein Grund für das weitgehende Scheitern antiinflammatorischer Therapien in klinischen Studien sein.⁵⁶ Obwohl bspw. die Blockierung des Adhäsionsmoleküls *intracellular-adhesion-molecule* (ICAM)-1 mittels Antikörpern⁵⁷ oder von Interleukin (IL)-1 Rezeptoren mittels *recombinant human IL-1 receptor antagonist* (rhIL-1Ra)⁵⁸ in präklinischen Studien vielversprechende Ergebnisse zeigte, bestätigte sich dies in klinischen Studien mit dem Anti-ICAM-1 Antikörper Enlimomab⁵⁹ und rhIL-1Ra⁶⁰ nicht. Allerdings kann auch die Immunantwort auf den nicht humanisierten Antikörper Enlimomab zu dem verschlechterten Endergebnis der mit Enlimomab behandelten Patienten beigetragen haben.⁵⁹ Auch Limitationen der verwendeten Schlaganfallmodelle, sowie methodologische Probleme können zu dieser Diskrepanz geführt haben (siehe auch 4.2.2, S. 80). Eine weitere mögliche Ursache für das Scheitern dieser meist auf die Modulation eines einzelnen Signalweges ausgerichteten Behandlungsansätze könnte sein, dass die postischämische Inflammation ihre Effekte über redundante Signalwege entfaltet. Es wäre somit womöglich effektiver einen Modulator verschiedener inflammatorischer Signalwege zu finden und diesen pharmakologisch zu beeinflussen. Ein solcher Modulator könnte die Gruppe der *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) sein.³⁹

1.2 Die Gruppe der *peroxisome proliferator-activated* Rezeptoren als mögliche Zielstruktur einer neuroprotektiven Therapie

Die Gruppe der *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) gehört zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren, zu der auch die Rezeptoren für Steroidhormone, Schilddrüsenhormone, Vitamin A und D u. a. gehören. Bereits in den 1960er Jahren war die

Einleitung

lipidsenkende und die Proliferation der Peroxisomen stimulierende Wirkung von Clofibrat bekannt.⁶¹ Es dauerte jedoch fast 30 Jahre bis der Rezeptor für diese unter dem Namen *peroxisome proliferator* zusammengefassten Substanzen gefunden wurde und als *peroxisome proliferator-activated receptor* in der Maus beschrieben wurde.⁶² In den nachfolgenden Jahren wurden zunächst in Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) drei Isoformen beschrieben, die als xPPAR α , β und γ bezeichnet wurden.⁶³ Lange war unklar, ob die in Mensch und Maus gefundenen Rezeptorsubtypen Homologe oder weitere Isoformen darstellten. Insbesondere das Verhältnis der 1992 im Menschen als *nuclear hormone receptor* (NUC)1⁶⁴ und 1994 in der Maus als PPAR δ ⁶⁵ beschriebenen Subtypen zum xPPAR β konnte lange nicht geklärt werden. Heute geht man davon aus, dass NUC1, PPAR δ und xPPAR β Homologe desselben Rezeptorsubtyps darstellen, sodass insgesamt von drei verschiedenen Isoformen des Rezeptors ausgegangen wird - α , β/δ (im Folgenden als δ bezeichnet) und γ . Diese unterscheiden sich in ihren Liganden, den Effekten, dem Expressionsmuster und der Regulation während der Entwicklung deutlich, obwohl sie eine hohe strukturelle Homologie aufweisen.^{63,65-67} Sie gelten als Schlüsselregulatoren des Lipidstoffwechsels, sind aber auch an der Glukosehomöostase, Zelldifferenzierung und der Entstehung von malignen Tumoren beteiligt.⁶⁸ In den letzten Jahren mehren sich zudem Hinweise, dass auch Entzündungsreaktionen durch diese Rezeptoren gesteuert werden.⁶⁹ Die nukleären Rezeptoren unterteilen sich in drei Klassen.⁷⁰ Die Klasse zu der die PPARs zählen umfasst mehrere ligandenaktivierte Rezeptoren, die mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) dimerisieren und hauptsächlich als Transkriptionsfaktoren wirken.⁷¹



Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines nukleären Rezeptors

Am Amino-Terminus sitzt die A/B Domäne, die eine ligandenunabhängige Transkriptionsaktivierungsfunktion (AF-1) besitzt. Es folgt eine Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Bindungsdomäne (C), die mit einem zwei Zinkfingermotiv an spezifische *ppar response elements* (PPRE) im Genom bindet. Kofaktoren können an die folgende Domäne D binden, die dem Protein zudem die Flexibilität gibt an die DNA als Dimer anzudocken. Am COOH terminalen Ende E/F befindet sich die Ligandenbindungsdomäne (LBD), die zudem eine ligandenabhängige Aktivierungsfunktion (AF-2) besitzt. Modifiziert nach⁷².

Wie fast alle nukleären Rezeptoren bestehen auch die PPARs aus vier Domänen – A/B, C, D und E/F (siehe Abb. 1.3, S. 8). PPARs beeinflussen den Zellmetabolismus und die Zellfunktion über verschiedene, zum Teil subtypspezifische Mechanismen. Sie fungieren als Transkriptionsfaktor und binden an PPRE, meist in der Promotorregion verschiedener Gene.⁷³ Das PPRE besteht aus zwei Hexanukleotiden mit einer AGGTCA Sequenz, die durch einen *single nucleotide spacer*

Einleitung

getrennt sind.⁷⁴ Dieses als *direct repeat (DR)-1* bezeichnete Element ist spezifisch für PPRE und unterscheidet diese dadurch von Bindungssequenzen anderer nukleärer Rezeptoren. Im ligandenungebundenen Zustand sind an der D-Domäne sogenannte Korepressoren, wie z. B. der *nuclear receptor co-repressor (NCoR)* oder der *silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor (SMRT)* gebunden, die eine Transkription des Zielgens unter anderem durch Rekrutierung von Histondeacetylasen unterdrücken. Bindet nun ein Ligand an die E/F-Domäne des Rezeptors, begünstigt dies die Dimerisierung mit RXR und einen Austausch der Korepressoren gegen Koaktivatoren, wie z. B. den *steroid receptor co-activator (SRC)-1*, den *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (PGC)-1 α* oder das *PPAR binding protein (PBP)*, die u.a. über eine Histonacetylierung die Transkription des Zielgens fördern.⁷⁵ Dieser Austausch von Korepressoren gegen Koaktivatoren wird durch *nuclear co-repressor exchange factors* geregelt. Insbesondere sind dabei *transducin β -like (TBL)-1* und das *transducin β -like related protein (TBLR)-1* zu nennen, die wahrscheinlich über die Aktivierung des Ubiquitinierungsmechanismus einen Abbau der Korepressoren in Proteasomen begünstigt. In den letzten Jahren sind eine Reihe weiterer Koaktivatoren und Korepressoren beschrieben worden, deren Spezifität für einen der PPAR-Subtypen die spezifische Regulation unterschiedlicher Gene durch die verschiedenen PPAR-Subtypen erklären könnte. Auch die unterschiedliche posttranslationale Modifikation, Bindung verschiedener RXR Subtypen, unterschiedliche A/B-Domänen und unterschiedliche nichtgenomischen Effekte tragen zur spezifischen Wirkung der drei PPARs bei.⁷⁶ Zusätzlich zur Wirkung als Transkriptionsfaktor besitzen PPARs Effekte, die nicht direkt, sondern über die Modulation anderer Transkriptionsfaktoren auf die Genexpression Einfluss nehmen. Bei dem als Transrepression bezeichneten Prozess wird durch die Ligandenbindung an einen PPAR entweder direkt über Protein-Protein-Interaktion ein zweiter Transkriptionsfaktor gebunden (*tethering*), oder es werden für diesen nötige Koaktivatoren "weggefangen" (*sequestration*) oder Korepressoren freigesetzt (*inverse sequestration*). Insgesamt wird somit die Transkription eines Zielgens vermindert.⁷⁷

Schon die natürlichen Liganden der PPARs legen eine Rolle dieser Rezeptoren in der Regulation des Stoffwechsels nahe. Eine Vielzahl verschiedener Fettsäuren, Eicosanoide und Komponenten von *very low density lipoprotein (VLDL)s* können in der recht unspezifischen Ligandentasche der Rezeptoren mit relativ niedriger Affinität binden. Es wurde deshalb postuliert, dass PPARs als Lipidsensoren fungieren.⁷⁸ PPAR α ist dabei besonders an der Regulation der β -Oxidation beteiligt⁷⁹ und wird klinisch auch zur Behandlung der Dyslipidämie eingesetzt. PPAR γ reguliert maßgeblich die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten und wird in der Klinik bei

Diabetes Typ 2 als Insulinsensitizer benutzt. Auch die antiinflammatorische und eine mögliche neuroprotektive Wirkung von PPAR α und γ ist relativ gut dokumentiert.^{69,77,80-83} Selektive PPAR δ -Agonisten hingegen wurden erst vor einigen Jahren erhältlich, sodass es bisher nur wenige Daten zur Wirkung dieses Subtyps gibt. Erste Ergebnisse zum selektiven PPAR δ -Agonisten GW501516 in der Behandlung von Übergewicht, Diabetes und Dyslipidämie zeigen jedoch einen positiven Effekt auf Parameter des Metabolischen Syndroms.⁸⁴⁻⁸⁷

Gleichzeitig stellt PPAR δ die im Gehirn bei weitem am häufigsten vorkommende Isoform der PPARs dar.⁶⁷ Zudem mehren sich in den letzten Jahren die Hinweise, dass PPAR δ an der Modulation der Entzündungskaskade und der Regulation von Zellüberleben beteiligt sein könnte.^{69,77,88}

1.2.1 Der Subtyp PPAR δ

PPAR δ wird in der Embryonalentwicklung mit einem Höhepunkt um den 14. Tag der Embryonalentwicklung in hohem Maße exprimiert. Die Expression in allen Organen, insbesondere jedoch im Gehirn, legt eine wichtige Rolle in der Entwicklung nahe.⁶⁶ In der Maus konnte zudem die Expression in Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen direkt nachgewiesen werden.⁸⁹⁻⁹² Auch bei der Ausbildung der Plazenta spielt PPAR δ eine wichtige Rolle.⁹³ Tiere, die durch gentechnische Manipulation so verändert sind, dass sie kein PPAR δ besitzen (Knock-out (KO)-Tiere), sind daher zwar lebensfähig, aber deutlich kleiner und leichter als ihre Wurfgeschwister.⁹⁴

Aus Knock-out- und Überexpressionsstudien ist bekannt, dass PPAR δ , wie auch PPAR α , an der Adipogenese beteiligt ist.^{93,95} Eine Überexpression im Muskel führt zu vermindertem Übergewicht und besserer Kontrolle des Blutzuckerspiegels in Mäusen, die mit einer hoch fetthaltigen Nahrung ernährt wurden. Außerdem führte diese Überexpression zu einer Veränderung der Muskelzusammensetzung mit einem starken Anstieg des Anteils des Muskelfasertyps I, der mit einer drastisch verbesserten Ausdauer der Mäuse und einer Verdopplung der Laufstrecke einhergeht.⁹⁶ Es ist daher nicht verwunderlich, dass sich mit dem Verfügbarwerden der ersten PPAR δ -Agonisten auch die Dopingfälle mit diesen Mitteln im Spitzensport mehren⁹⁷ und diese sich auch unter Hobbyathleten großer Beliebtheit erfreuen.⁹⁸

Einleitung

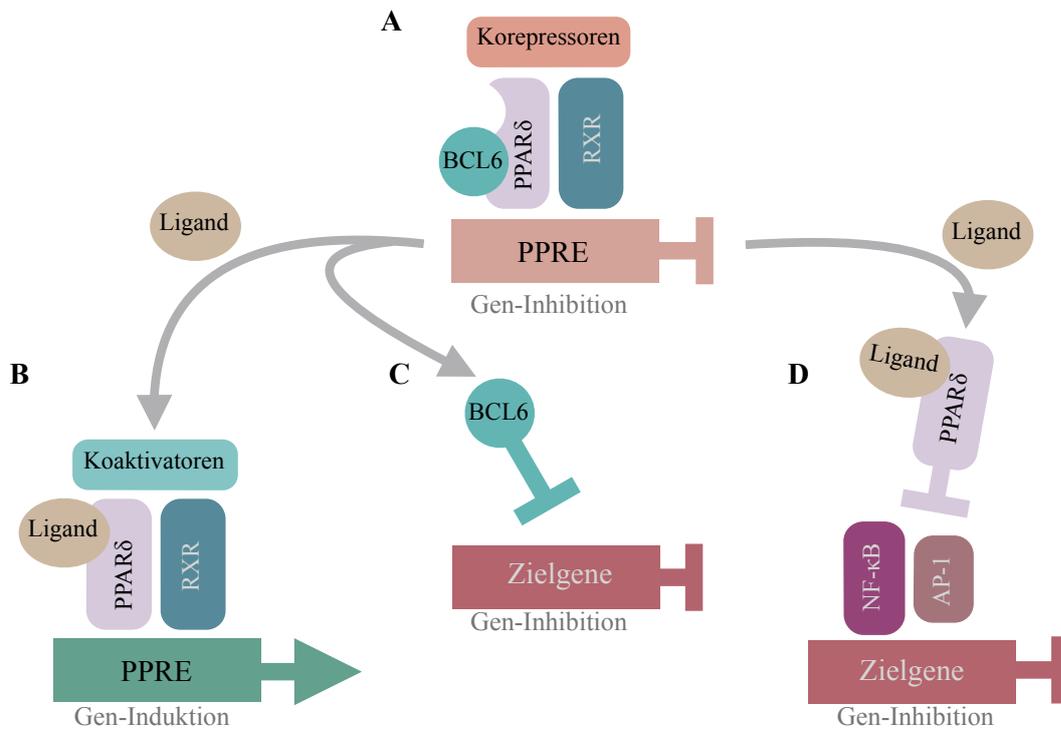


Abb. 1.4: Molekulare Effekte einer PPAR δ -Aktivierung

(A) Im Liganden-ungebundenen Zustand ist der PPAR δ an einen Korepressorkomplex gebunden und inhibiert die Genexpression von Zielgenen. (B) Bindet ein Ligand an PPAR δ führt dies zum Austausch des Korepressorkomplexes mit einem Koaktivator und zur Induktion von Zielgenen. (C) Der Transkriptionsfaktor *B-cell lymphoma* (BCL)-6 wird durch die Ligandenbindung aus der Bindung mit PPAR δ gelöst und inhibiert als Transkriptionsfaktor die Expression von Zielfaktoren, wie MCP-1, IL-6 oder MCP-1 α . (D) Durch direkte Interaktion hemmen ligandengebundene PPAR δ die Funktion von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) und Aktivator Protein (AP)-1 und damit die Expression von Zielfaktoren, wie IFN- γ , IL-1 oder IL-6.

Allerdings wurden bereits früh Bedenken zur Sicherheit dieser neuen Substanzklasse laut und 2013 veröffentlichte die *World Anti-Doping Agency* (WADA) eine der sehr selten ausgesprochenen ausdrücklichen Warnungen vor der Einnahme von GW501516.⁹⁹ Grund für die Warnung war die Sorge vor einer kanzerogenen Wirkung des PPAR δ -Agonisten bei dauerhafter Einnahme. In den letzten Jahren konnte in experimentellen Modellen maligner Tumore sowohl eine wachstumsfördernde, als auch eine kanzeroprotektive Wirkung von PPAR δ -Agonisten *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden.^{100,101} Insgesamt scheint die Art der Wirkung eine Funktion von Einnahmedauer und vor allem der Dosierung zu sein, sodass womöglich nicht-PPAR δ -spezifische Effekte der Agonisten für den schädigenden Einfluss verantwortlich sind.¹⁰²

Erste Hinweise auf eine Rolle von PPAR δ in der Regulation der Entzündungsreaktion kamen aus Studien mit Knock-out-Mäusen, die nach Applikation von O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) eine verstärkte Entzündungsantwort zeigten.¹⁰³ PPAR δ ist der in der Haut vornehmlich

vorkommende Subtyp der PPARs.¹⁰⁴ Während des gesamten Prozesses der Wundheilung wird die Expression von PPAR δ durch proinflammatorische Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor (TNF) α und INF γ gesteigert.¹⁰⁵ Dabei wird angenommen, dass PPAR δ die Differenzierung von Keratinozyten sowie die Entzündungsreaktion in geordneten Bahnen hält.¹⁰⁶ Die Kontrolle der IL-1 vermittelten proinflammatorischen Kaskade durch die von PPAR δ ausgelöste Produktion des IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen.¹⁰⁷ Auch bei inflammatorischen Hauterkrankungen wie der Psoriasis ist PPAR δ hochreguliert und die Behandlung mit PPAR δ -Agonisten kann zu hyperkeratotischen Hautläsionen führen.^{108,109} Ein Grund hierfür könnte die Rolle von PPAR δ in der Apoptoseregulation und der Förderung des Zellüberlebens durch PPAR δ sein.¹¹⁰ Ausgehend von diesen Hinweisen wurden auch die Effekte einer PPAR δ -Aktivierung auf Neuroinflammation und Neuroprotektion untersucht.^{88,92}

1.2.2 Einfluss von PPAR δ auf die Neuroinflammation

Wie oben erwähnt, kann die Neurovaskuläre Einheit (*neurovascular unit*) als Schauplatz der Akteure der postischämischen Kaskade aufgefasst werden. Diese umfasst die Gefäße mit den dazugehörigen Elementen (Endothelzellen, Basallamina Matrix, Astrozytenendfüße und Perizyten), Astrozyten, Neuronen, Mikroglia und Oligodendrozyten.⁴⁰ Dieses Konzept betont die Wichtigkeit der Interaktion dieser Akteure für den streng geregelten Ablauf der Gewebeantwort auf ein ischämisches Ereignis. Vor allem durch die Verfügbarkeit spezifischer PPAR δ -Agonisten (z. B. L-165041, GW0742 und GW501516) konnte die Rolle von PPAR δ in der Regulation der Neuroinflammation und eine mögliche Neuroprotektion näher untersucht werden (siehe auch Abb. 1.5, S. 13).

Einleitung

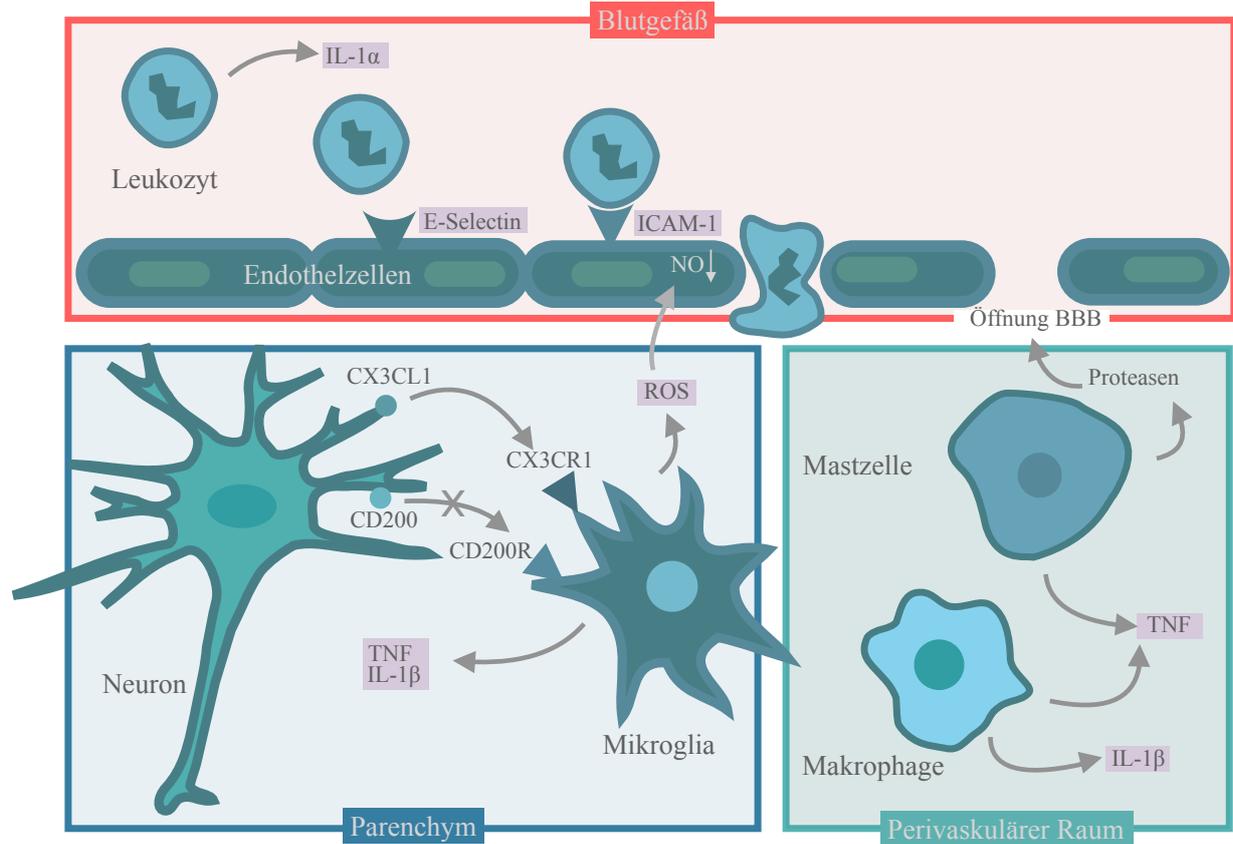


Abb. 1.5: Postischämische Inflammation und PPARδ-Angriffspunkte

Dargestellt sind postischämisch ablaufende inflammatorische Prozesse in der Neurovaskulären Einheit. Violett hinterlegt sind Faktoren, die durch eine Aktivierung von PPARδ beeinflusst werden. Einzelheiten siehe Text. Abbildung modifiziert nach⁴⁹.

1.2.2.1 Einfluss von PPARδ auf Zytokine, Chemokine und Transkriptionsfaktoren

Proinflammatorische Faktoren

Wichtigste Vermittler in diesem in einer organisierten Kaskade ablaufenden Prozess sind die bereits angesprochenen Zytokine und Chemokine. Eine zentrale Rolle nehmen dabei die proinflammatorischen Zytokine TNFα, Interferon (INF)γ, IL-1β, IL-6 sowie die Chemokine *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 und *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1α ein (siehe Tab. 1.1, S. 16). Die Produktion dieser Zytokine wird durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren gesteuert. Der Calciumeinstrom in die Neuronen, der Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies und auch die Hypoxie selbst führen zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB), *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1, *interferon regulatory factor* (IRF)-1 und der *signal transducers and activators of transcription* (STAT)-3 in Zellen der neurovaskulären Einheit, die die Zytokinproduktion regeln.¹⁰ Wahrscheinlich über die direkte Interaktion mit der

p65-Untereinheit des NF- κ B verhindern ligandengebundene PPAR δ dessen Translokation in den Nukleus und dadurch die Induktion dieser proinflammatorischer Signale (TNF α , IL-1 β , IL-6 oder MCP-1).¹¹¹⁻¹¹³ Womöglich führt PPAR δ auch über eine Hemmung der *extracellular-signal regulated kinase* (ERK)1 und ERK2 Phosphorylierung und des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalwegs zu einer verminderten Aktivierung von NF- κ B.¹¹⁴ Einer der direkten Gegenspieler von NF- κ B ist der Transkriptionsfaktor *B-cell lymphoma* (BCL)-6. BCL-6 ist ein Transkriptionsfaktor, der als Repressor der Transkription die Induktion proinflammatorischer Mediatoren durch NF- κ B in Makrophagen reguliert.¹¹⁵ Durch das Andocken eines Liganden an PPAR δ wird die in der Abwesenheit eines Liganden bestehende Bindung von BCL-6 an PPAR δ gelöst und dadurch die nukleäre Verfügbarkeit und Aktivität von BCL-6 erhöht; proinflammatorische Signale wie MCP-1, IL-6 werden vermindert exprimiert.^{116,117}

Durch den Untergang von Neuronen werden zudem Stoffe, so genannte *danger associated molecular pattern molecules* (DAMPs), freigesetzt, die selbst als Signale in der inflammatorischen Antwort dienen.¹¹⁸ Sie binden an *Toll-like receptors* (TLRs) auf Mikroglia, perivaskulären Makrophagen und Endothelzellen und führen über einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen Signalweg zur Aktivierung proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren (hauptsächlich NF κ B und AP-1).^{56,119,120}

Antiinflammatorische Faktoren

Für den koordinierten Ablauf und das Abklingen der Inflammation ist das Gleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Faktoren von entscheidender Bedeutung.¹²¹

Die Zytokine IL-10 und *transforming growth factor* (TGF)- β nehmen in zahlreichen Organen eine zentrale Rolle in der Hemmung inflammatorischer Prozesse ein. Der unter anderem in Glia und Makrophagen nach einem Schlaganfall gebildete TGF- β hat antiinflammatorische Eigenschaften¹²² und fördert die Bildung des immunmodulatorischen Zytokins IL-10 unter anderem in regulatorischen T-Zellen.¹²³ Auch die Bildung von Wachstumsfaktoren (wie *Insulin-like growth factors* (IGF)-1, *fibroblast growth factor* (FGF)-2 oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in Zellen des Immunsystems, Neuronen und Astrozyten ist essentiell für post-ischämische Reparaturprozesse.^{49,124} PPAR δ induziert nach Ligandenbindung die Expression antiinflammatorischer Mediatoren wie *regulator of G-protein signaling* (RGS)4 bzw. RGS5,¹¹⁷ TGF β ¹²⁵ und IL-1ra¹⁰⁷ sowie antioxidativer Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD) oder die Katalase.¹²⁶

Interessanterweise sind genetisch modifizierte Makrophagen, die keinen PPAR δ besitzen, auch nicht in der Lage zum IL-10 produzierenden, eher antiinflammatorischen Phänotyp M2 zu

wechseln und Liganden am PPAR δ könnten direkt an diesem Umschalten von einem proinflammatorischen M1 in einen eher antiinflammatorischen M2 Phänotyp beteiligt sein.¹²⁷

1.2.2.2 Einfluss von PPAR δ auf das vaskuläre Kompartiment

Die inflammatorische Antwort des Gehirns auf eine Ischämie beginnt sofort nach einem Gefäßverschluss im intravaskulären Kompartiment. Hypoxie und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen zu einer Aktivierung von Blutplättchen und Endothelzellen. Die darauf folgende Translokation von P-Selectin, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-1 β sowie die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke führt zu einem vermehrten Anhaften und Übertritt von Leukozyten aus der Blutbahn in das Hirngewebe.^{128,129} Durch die gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine werden zudem die Expression von ICAM-1 und von *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 auf Endothelzellen und die Ausschüttung von MCP-1 gesteigert und so auch längerfristig vermehrt inflammatorische Zellen aus der Blutbahn in das Infarktgebiet gelockt.

Dabei infiltrieren zuerst neutrophile Granulozyten das Gehirn,¹³⁰ gefolgt von Monozyten und Lymphozyten. Die Ausschüttung von Proteasen, wie Matrix-Metalloproteasen (MMP),^{131,132} und proinflammatorischen Zytokinen aus Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen der perivaskulären Nische führt zu einer weiteren Öffnung der Blut-Hirn-Schranke und der Ausbildung eines extrazellulären Ödems.

Durch Behandlung mit PPAR δ -Agonisten wird die Entzündungsantwort der Endothelzellen gehemmt, die zur Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom führt. So werden die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und endotheliales Selectin (E-Selectin) sowie das Chemokin MCP-1 vermindert exprimiert^{111,126,133} und über die vermehrte Bildung von SOD und Katalase wird das Gewebe besser vor oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies geschützt.^{134,135} Auch die Aktivität der MMP-9 wird durch eine Behandlung von glatten Gefäßmuskelzellen mit einem PPAR δ -Agonisten *in vitro* vermindert¹³⁶ und die Bildung von Inhibitoren der MMPs, den *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMPs), in Makrophagen wird durch PPAR δ -Agonisten gesteigert.¹¹⁷ Ebenfalls in glatten Gefäßmuskelzellen wird die durch IL-1 β ausgelöste Bildung von MCP-1 durch Behandlung mit einem PPAR δ -Agonisten, wahrscheinlich indirekt über die Induktion des antiinflammatorischen Mediators TGF β , gehemmt.¹²⁵

1.2.2.3 Einfluss von PPAR δ auf die Aktivierung der Mikroglia

Auch die hirneigenen immunologischen Zellen, die Mikroglia, werden zu einem frühen Zeitpunkt in der ischämischen Kaskade innerhalb von Minuten aktiviert.^{137,138} Zur Aktivierung der Mikroglia trägt zudem die gesteigerte Konzentration von Glutamat und Adenosintriphosphat (ATP) im Extrazellularraum sowie der Verlust der Zell-zu-Zell-Interaktion zwischen Neuronen und Mikroglia (Verlust der CD200/CD200R- und die *C-X3-C motif 1* Liganden-Rezeptor (CX3CL1/CX3CR1)-Interaktion) bei.^{49,139,140} Wahrscheinlich handelt es sich auch bei der NO-Produktion durch die iNOS aus Mikrogliazellen um einen der Mechanismen der Zellschädigung durch aktivierte Mikroglia¹⁴¹ und führt womöglich wiederum selbst zu einer Aktivierung von Mikroglia.¹⁴²

Eine Behandlung mit PPAR δ -Agonisten scheint hingegen die Produktion von TNF α und iNOS in Mikrogliazellen zu vermindern.^{143,144}

Tab. 1.1: Wichtige Mediatoren postischämischer Inflammation

Dargestellt ist eine Auswahl der wichtigsten pro- und antiinflammatorischen Mediatoren. Modifiziert nach⁵⁶.

	Name	Herkunft	Zeitlicher Verlauf	Angenommener Signalweg	Effekt
Proinflammatorisch					
Zytokine	TNF- α	Mikroglia/Makrophagen, Astrozyten, Neurone und Endothelzellen	Innerhalb 30 min-6 h erhöht, Höchststand nach 12-24 h, erhöht für mehrere Tage	TNF- α /TNF-Rezeptor p75 Signalweg	Neurotoxisch
	IL-1 β	Mikroglia/Makrophagen, Astrozyten, Neurone und Endothelzellen	Innerhalb 2-6 h erhöht, Höchststand nach 12-24 h	IL-1 β /NF- κ B und MAPK Signalweg	Neurotoxisch
	IL-6	Mikroglia/Makrophagen, Astrozyten, Neurone und Endothelzellen	Innerhalb von 10 h erhöht, Höchststand nach 18 h	IL-6/STAT Signalweg	Neurotoxisch
Chemokine	MCP-1	Neuronen, Astrozyten, Mikroglia	Innerhalb von 3-6 h erhöht, Höchststand nach 12-48 h	MCP-1/MAPK Signalweg	Neurotoxisch
	MIP-1 α	Neuronen und Mikroglia	Innerhalb 2 h erhöht, Höchststand nach 4 h	MIP-1 α /MAPK Signalweg	Neurotoxisch
Antiinflammatorisch					
	IL-10	Mikroglia/Makrophagen, Th1, Th2, B-Zellen, Astrozyten	Innerhalb von 12 h erhöht, Höchststand nach 3 Tagen	IL-10/STAT und MAPK Signalweg	Neuroprotektiv
	TGF- β	Mikroglia/Makrophagen, regulatorische T-Zellen	Innerhalb von 3 h erhöht, Höchststand nach 24 h	TGF- β Signalweg	Neuroprotektiv
	IGF-1	Mikroglia, Astrozyten, Endothelzellen	Innerhalb von 12 h erhöht, Höchststand nach 24 h	IGF-1 Signalweg	Neuroprotektiv

1.2.3 Bisherige Ergebnisse zur Rolle von PPAR δ im Schlaganfallmodell

Die Rolle von PPAR δ im Schlaganfall wurde in mehreren in-vitro-Modellen sowie in vivo in permanenten und transienten *middle cerebral artery occlusion* (MCAo)-Modellen in Mäusen und Ratten untersucht. In einer ersten Studie an PPAR δ -Knock-out-Mäusen wurde in einem distalen permanenten MCAo-Mausmodell eine verdoppelte Infarktgröße und eine erhöhte Konzentration von INF γ bei gleichzeitiger Reduktion von Mangan Superoxiddismutase (MnSOD) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gefunden. Interessanterweise war im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren bei Knock-out-Tieren nach MCAo TNF α nicht erhöht. Bei PPAR α -Knock-out-Tieren fanden die Autoren keine Unterschiede in der Infarktgröße zu Wildtyp-Tieren.¹⁴⁵ In einer weiteren Arbeit zu PPAR α - und PPAR δ -Knock-out-Mäusen im distalen permanenten MCAo-Modell fanden Pialat et al. in der Magnetresonanztomographie (MRT) für **beide** Gruppen ein signifikant verkleinertes Infarktvolumen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren und kamen zu dem Schluss, dass sowohl PPAR α als auch PPAR δ eine neuroprotektive Rolle im Schlaganfall spielen könnten.¹⁴⁶ Auch der selektive Knock-out in glatten Gefäßmuskelzellen in Mäusen führt wahrscheinlich über eine vermehrte Aktivierung von MMP-9 zu einer Vergrößerung des Infarktareals, sodass Yin et al. ebenfalls eine protektive Rolle von PPAR δ im Schlaganfall postulierten.¹³⁶ So fanden auch Iwashita et al., dass die intrathekale Verabreichung von GW501516 24 h vor Infarktinduktion mittels intraluminalem (proximalem) Verschluss der Arteria cerebri media (MCA) bei Ratten das Infarktvolumen 24 h nach MCAo reduziert und die proapoptotischen Faktoren *cysteine-aspartic acid protease* (Caspase)-3 und Caspase-7 in Neuronen hemmt.¹⁴⁷ Zu einem ganz ähnlichen Ergebnis kamen auch Yin et al., die Mäuse ebenfalls 24 h vor proximalem MCAo Verschluss intrathekal mit GW501516 behandelten und eine Infarktreduktion sowie eine Hemmung der Mikro-Ribonukleinsäure miR-15a und eine dadurch vermehrte Expression des antiapoptotischen BCL-2 beobachteten.¹⁴⁸ Auch der PPAR γ -Agonist Pioglitazon soll bei einer fünftägigen intrathekalen Vorbehandlung vor transientem proximalem MCA Verschluss über eine PPAR δ -Aktivierung und IL-1ra Induktion das Infarktvolumen 24 und 48 h nach MCAo verringern.¹⁴⁹ Allerdings fanden Ji et al. in einem längeren Zeitfenster von 6 Wochen keine Unterschiede in der Infarktgröße und der Verhaltensanalyse im Vergleich zur Vehikelgruppe¹⁵⁰ und Pioglitazone aktiviert PPAR δ wahrscheinlich nicht in relevantem Maße.¹⁵¹ In einer aktuellen Studie untersuchten Chao et al. den Effekt des selektiven PPAR δ -Agonisten GW0742 auf Infarktgröße und postischämische Inflammation in einem proximalen transienten MCAo-Rattenmodell.¹⁵² Die intraperitoneale

Gabe von GW0742 30 Minuten (min) vor MCAo reduzierte sowohl die Infarktgröße als auch die Konzentrationen von NF- κ B, TNF α und IL-1 β im Vergleich zur Vehikelgruppe.

Gemeinsam ist allen bislang verfügbaren Arbeiten zu spezifischen PPAR δ -Agonisten im Schlaganfall die ausschließlich parenterale, meist intrathekale Gabe des Agonisten zu einem Zeitpunkt vor Verschluss des Gefäßes. Auch wurde bisher in keiner Arbeit der längerfristige Effekt einer Behandlung mit einem selektiven PPAR δ -Agonisten auf das funktionelle Endergebnis betrachtet. Zwei häufig genannte Gründe für das Scheitern der Translation von präklinisch vielversprechenden Substanzklassen in die klinische Anwendung sind die präklinisch meist fehlende Evaluierung klinisch relevanter Ergebnisparameter wie dem funktionellen Endergebnis und die ausschließliche Untersuchung einer Vorbehandlung mit der fraglichen Substanzklasse.

1.3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit soll deshalb sein, den Einfluss eines spezifischen PPAR δ -Agonisten auf die Infarktgröße und das funktionelle Endergebnis zu untersuchen. Um eine möglichst hohe Aussagekraft der Arbeit für eine potentielle Translation der Substanzklasse zu gewährleisten, wurden die zu diesem Zweck entworfenen Richtlinien des *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* (STAIR) berücksichtigt. STAIR wurde Ende der 90er Jahre als Reaktion auf das anhaltende Scheitern der Translation präklinisch in Modellen des Schlaganfalls vielversprechender (v.a. neuroprotektiver) Substanzen in die klinische Versorgung ins Leben gerufen¹⁵³ und für die Untersuchung neuroprotektiver Substanzen 2009 erneut aktualisiert.¹⁵⁴ Diesen Richtlinien folgend soll daher zunächst eine Dosis-Wirkungs-Kurve für den verwendeten neuartigen, bisher nicht verfügbaren PPAR δ -Agonisten SAR145 im Schlaganfall erstellt werden. Aufgrund der guten oralen Bioverfügbarkeit der Substanz konnte, im Gegensatz zur Mehrzahl der bisherigen Untersuchungen mit intrathekaler Gabe, eine orale Behandlung gewählt werden. Dies ist insbesondere im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz der Substanz relevant, da im klinischen Setting eine intrathekale Applikation ungünstig ist. Mit der durch die Dosis-Wirkungs-Kurve bestimmten effektivsten Dosis der Substanz soll dann das Zeitfenster nach MCAo bestimmt werden, in dem die Behandlung mit SAR145 zu einer Neuroprotektion führt. Um die Spezifität einer möglichen Neuroprotektion für eine Aktivierung von PPAR δ zu belegen, soll im nächsten Schritt in PPAR δ -Knock-out-Tieren die Substanz in ihrer effektivsten Dosis und im optimalen Zeitfenster auf eine mögliche neuroprotektive Wirkung untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurde als Ergebnisparameter die histologisch bestimmte Infarktgröße nach 72 h gewählt. Ausgehend von diesen Erkenntnissen soll auch das funktionelle Endergebnis

bis 28 Tage nach MCAo mithilfe einer Reihe an Verhaltensuntersuchungen bestimmt werden. Um bisher beschriebene mögliche Mechanismen der Neuroprotektion durch PPAR δ -Aktivierung zu untersuchen, soll zudem der Effekt einer Behandlung mit SAR145 auf die Aktivierung von Mikroglia und Endothelzellen bestimmt werden. Die vorliegende Arbeit soll klären, ob die Behandlung mit einem PPAR δ -Agonisten bei Befolgung der von STAIR vorgeschlagenen Maßnahmen zur Verbesserung der Aussagekraft präklinischer Studien einen neuroprotektiven Effekt im Maus-Schlaganfallmodell aufweist. Zur Klärung dieser Frage wurden folgende Hypothesen aufgestellt.

1.3.1 Fragestellungen und Hypothesen

Für alle Hypothesen wird ein Signifikanzniveau von $\alpha \leq .05$ als signifikanter Unterschied angesehen. SAR145 behandelte Tiere werden im folgenden als Verumgruppe, mit Vehikel behandelte Tiere werden im folgenden als Vehikelgruppe bezeichnet.

1.3.1.1 Fragestellungen und Hypothesen zur Testung von SAR145 in vivo

Fragestellung 1

Zeigt die Verumgruppe bei einer Behandlung zum Zeitpunkt der Reperfusion im Vergleich zur Vehikelgruppe eine dosisabhängige Verkleinerung der histologisch nach 72 h bestimmten Infarktgröße und wie hoch ist die effektivste Dosis X?

Hypothesen zu Fragestellung 1

H₁1: Tiere der Verumgruppe zeigen im Vergleich zur Vehikelgruppe dosisabhängig eine signifikante Reduktion der Infarktgröße mit einem Minimum bei Dosis X.

H₀1: Tiere der Verumgruppe zeigen im Vergleich zur Vehikelgruppe keine signifikante Reduktion der Infarktgröße.

Fragestellung 2

Zeigt die Verumgruppe bei einer Behandlung mit der effektivsten Dosis X auch bei einer initialen Behandlung frühestens drei Stunden nach Reperfusion im Vergleich zur Vehikelgruppe eine vom Zeitpunkt der initialen Behandlung abhängige Reduktion der histologisch nach 72 h bestimmten Infarktgröße und was ist der späteste Zeitpunkt T nach Reperfusion bei dem eine Behandlung mit SAR145 noch zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße führt?

Hypothesen zu Fragestellung 2

H₁2: Tiere der Verumgruppe zeigen bei Behandlung frühestens drei Stunden nach Reperfusion im Vergleich zur Vehikelgruppe eine vom Zeitpunkt der initialen Gabe abhängige Reduktion der Infarktgröße. Es ergibt sich ein Zeitpunkt T als maximale Verzögerung der initialen Behandlung, die noch zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße führt.

H₀2: Tiere der Verumgruppe zeigen im Vergleich zur Vehikelgruppe bei einer Behandlung frühestens drei Stunden nach Reperfusion keine signifikante Reduktion der Infarktgröße.

Fragestellung 3

Zeigt die Verumgruppe der Knock-out-Tiere bei einer Behandlung zum Zeitpunkt der Reperfusion mit der Dosis X im Vergleich zur Knock-out-Vehikelgruppe eine Verkleinerung der histologisch nach 72 h bestimmten Infarktgröße?

Hypothesen zu Fragestellung 3

H₁3: Tiere der Knock-out-Verumgruppe zeigen im Vergleich zur Knock-out-Vehikelgruppe eine signifikante Reduktion der Infarktgröße.

H₀3: Tiere der Knock-out-Verumgruppe zeigen im Vergleich zur Knock-out-Vehikelgruppe keine signifikante Reduktion der Infarktgröße.

Fragestellung 4

Zeigt die Verumgruppe bei einer initialen Behandlung zum Zeitpunkt T mit der Dosis X im Vergleich zur Vehikelgruppe in der Verhaltensanalyse eine Verbesserung des funktionellen Endergebnisses bei einer Beobachtung bis 28 Tage nach MCAo?

Hypothesen zu Fragestellung 4

H₁4: Tiere der Verumgruppe zeigen bei einer initialen Behandlung zum Zeitpunkt T mit der Dosis X im Vergleich zur Vehikelgruppe ein signifikant verbessertes funktionelles Endergebnis in mindestens einem der verwendeten Verhaltenstests bei einer Beobachtung bis 28 Tage nach MCAo.

H₀4: Tiere der Verumgruppe zeigen bei einer initialen Behandlung zum Zeitpunkt T mit der Dosis X im Vergleich zur Vehikelgruppe in keinem der verwendeten Verhaltenstest ein signifikant verbessertes funktionelles Endergebnis.

Fragestellung 5

Zeigt die Verumgruppe bei einer initialen Behandlung zum Zeitpunkt T mit der Dosis X im Vergleich zur Vehikelgruppe in der MRT Bildgebung zu den Zeitpunkten 4, 10 und 28 Tage nach MCAo eine signifikante Reduktion der Infarktgröße?

Hypothesen zu Fragestellung 5

H₁5: Tiere der Verumgruppe zeigen bei einer initialen Behandlung zum Zeitpunkt T mit der Dosis X in der MRT Bildgebung mindestens zu einem der Zeitpunkte 4, 10 oder 28 Tage nach MCAo eine signifikante Reduktion der Infarktgröße.

H₀5: Tiere der Verumgruppe zeigen bei einer initialen Behandlung zum Zeitpunkt T mit der Dosis X in der MRT Bildgebung keine signifikante Reduktion der Infarktgröße

1.3.1.2 Fragestellungen und Hypothesen zur Testung von SAR145 in vitro

Fragestellung 6

Reduziert eine Behandlung mit SAR145 dosisabhängig die Stimulation von Mikrogliazellen durch ein proinflammatorisches Signal?

Hypothesen zu Fragestellung 6

H₁6: Mit SAR145 behandelte Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant reduzierte Stimulation durch ein proinflammatorisches Signal.

H₀6: Mit SAR145 behandelte Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrolle keine signifikant reduzierte Stimulation durch ein proinflammatorisches Signal.

Fragestellung 7

Wird durch die Behandlung mit SAR145 die durch einen proinflammatorischen Stimulus hervorgerufene Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen dosisabhängig vermindert?

Hypothesen zu Fragestellung 7

H₁7: Mit SAR145 behandelte Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen.

H₀7: Mit SAR145 behandelte Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrolle keine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer und Medien

FACS-Puffer	PBS, 0,5 % FKS, 1 % NaN_3 pH 8,0
PBS	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , ad 1l H_2O , pH 7.2
Mikroglia-Medium	DMEM (Biochrom GmbH), 10 % FKS (Biochrom GmbH), 1 % Natrium Pyruvat (Biochrom GmbH), 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom GmbH)
bEnd3 Medium	DMEM (Biochrom GmbH), 10 % FKS (Biochrom GmbH), 1 % Natrium Pyruvat (Biochrom GmbH), 4 mM L-Glutamin (Biochrom GmbH)

2.1.2 Chemikalien

Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland

Isofluran (Forene)

Apotheke Charité, Berlin, Deutschland

Bupivacain 1 % Gel

B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Perfusor-Spritze 50ml (8728844F)

Venofix® Sicherheitskanüle (05112577)

Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

FACSFlow (342003)

Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

Trypanblau (L6323)

L-Glutamin (K0283)

DMEM (FG0435)

Natrium Pyruvat (L0473)

Penicillin/Streptomycin (A 2212)

Fetales Kälberserum (FKS) (S0115) Lot# 0648x

Trypsin/EDTA (L2153)

Carl Roth GmbH u. Co KG, Karlsruhe, Deutschland

Roti®-Histol (6640.1)

2-Methylbutan (3927.1)

Merck Millipore, Billerica, MA, USA

Papanicolaous Lösung 1a Harris' Hämatoxylinlösung (109253)

Salzsäure (HCl) 25 % (137312)

eBioscience, Inc, Frankfurt am Main, Deutschland

Maus *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* GM-CSF (14-8331)

Maus *macrophage colony-stimulating factor* M-CSF (14-8983)

R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

Vitro-Clud® (04-0001)

Objektträger Superfrost plus 25x75x1mm (03-0060)

Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland

Octenisept

Sigma-Aldrich Corp., Saint Louis, MO, USA

Methylcellulose (M0512) Lot# 079K0054V

Tween 80 (P1754) Lot# BCBK6689V

Triton X-100 (93443) Lot# BCBD1546

4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (32670)

2.1.3 Antikörper

Abcam plc, Cambridge, Großbritannien

Anti ICAM-1 (ab 25475)

Invitrogen AG, Carlsbad, CA, USA

Goat Anti-Rat IgG Alexa Fluor 488 (A-11006)

2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

FACSCanto II

Falcon round bottom test tube 12X75mm (352008)

Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Inkubator CB53 (9040-0075)

Bruker Biospin, Ettlingen, Germany

Pharmascan 70/16

Material und Methoden

David Kopf, Tujunga, CA, USA

Stereotaktischem Rahmen (Model 930)

Docol Corp., Sharon, MA, USA

Monofilament (7019910PK5Re)

Dräger, Lübeck, Deutschland

Vapor 19.3 Isofluranvernebler

Feuerstein GmbH, Berlin, Deutschland

Nadeln (BER562-20)

Seidenfaden 7/0 (04311X)

Seidenfaden 5/0 (00497X)

Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland

Beheizbaren Unterlage (21061-10) mit rektaler Temperatursonde

Dumont #5 Pinzette (11252-20)

Gavage Kanülen 22 Gauge (18061-22)

Gefäßklemmenapplikator (00072-14)

Nadelhalter (12010-14)

TR-200 Temperaturregler (21052-00)

Vannas Federschere (15000-00)

InterFocus Imaging Ltd, Cambridge, Großbritannien

Northern Light Precision Illuminator, Model R 95

Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland

Jung Einbettmedium (029108926)

Kryostat CM1950 (14047742459)

Zoom 2000 (13312596V)

Medizinisch-Technische Labore, Berlin, Deutschland

Wärmematte für 7 Tesla MRT

Noldus Information Technology b.v., Wageningen, Niederlande

CatWalk XT 8.1

Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland

Fuchs-Rosenthal Zählkammer

Peco Services Ltd, Cumbria, Großbritannien

MediHEAT-Aufwachbox V1200

Perimed, Järfälla, Schweden

Laser-Doppler-Flussmessgerät Periflux System 5000

Adapter MasterProbe 418-1

MicroTip MT B500-0L120 (91-00124)

Photometrics, Tucson, AZ, USA

Kamera CoolSnap EZ

R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

Objektträger Superfrost plus 25x75x1mm (03-0060)

Randomness and Integrity Services Ltd., Dublin, Ireland

Random.org für iOS Version 1.0-1.1.2

SA Instruments, Inc., Stony Brook, New York, USA

Bio Trig System

Sigma-Aldrich Corp., Saint Louis, MO, USA

Teflon Gewebemörser und Glastubus (P7734-1EA)

S&T AG, Neuhausen, Schweiz

Gefäßclip B-1 (5020)

Thermo LabSystems, Chantilly, VA, USA

MRX TC Microplate Reader (99001840)

Toshiba Europe GmbH, Neuss, Deutschland

Camileo X200 (PA3973E-1C0K)

TSE Systems, Inc., Chesterfield, MO, USA

RotaRod (337500-M/A)

Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland

Operationsmikroskop (Stemi 2000 C) mit externer Lichtquelle (SteReo CL 1500 ECO)

2.1.5 Software

AnalyzeDirect, Inc., Lenexa, USA

Analyze 10.0

Bruker Biospin, Ettlingen, Germany

Paravision 4.0

Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

FACSDiva 6.0

Flowjo, LLC, Ashland, USA

Flowjo 10.0.7

IBM Corp. Armonk, USA

SPSS Statistics for Macintosh, Version 22.0

MEAN

Avidemux Version 2.6.0

InterFocus Imaging Ltd, Cambridge, Großbritannien

MCID Core™ 7.0 Rev.2.0

Perimed, Järfälla, Sweden

Perisoft

National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

ImageJ 1.47v

Noldus Information Technology, Niederlande

CatWalk XT 8.1

CatWalk XT 10.0

GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA

GraphPad Prism 5

2.1.6 Zelllinien

American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA

bEnd.3 Zellen, CRL-2299

2.1.7 Versuchstiere und Haltung

Die Haltung der Versuchstiere und Durchführung der Experimente wurde in Übereinstimmung mit dem aktuellen Tierschutzgesetz und mit Genehmigung des "Landesamtes für Gesundheit und Soziales - Berlin (LAGeSo Aktenzeichen G0178/13) durchgeführt. Für die Versuche zu den Fragestellungen 1 und 2 wurden männliche Wildtyp-Tiere vom Stamm C57BL/6 im Alter von 8-10 Wochen von Charles River (Wilmington, MA, USA) verwendet. Die Knock-out-Tiere (Männliche C57BL/6 PPAR δ -/-) für die Beantwortung der Fragestellung 3 (S. 20) wurden freundlicherweise von Frank J. Gonzales¹⁰³ bereitgestellt und über Florian Blaschke aus der Tiereinrichtung des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin bezogen. Alle Tiere wurden mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn im Tierstall der Experimentellen Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin eingestellt, um eine gute Adaptation an die veränderten Umgebungsbedingungen zu gewährleisten. Die Haltung der Mäuse erfolgte in Gruppen von 2-10 Tieren in entsprechenden Standardkäfigen, die bis auf einen einfachen Unterschlupf und etwas Nestmaterial keine weitere Ausstattung enthielten. Die Tiere wurden bei einer konstanten Umgebungstemperatur von 22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-

60 % gehalten. Die Beleuchtung folgte einem kontrollierten 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

2.1.8 PPAR δ -Agonist SAR145

Bei der getesteten Substanz SAR145 handelt es sich um einen synthetischen Agonisten am PPAR δ der im Rahmen eines *Material Transfer Agreements* von Sanofi Aventis bereitgestellt wurde. SAR145 zeigt eine ausgeprägte, mindestens 150-fache Selektivität gegenüber PPAR δ im Vergleich zu PPAR α und PPAR γ . Der Vorteil gegenüber bislang getesteten PPAR δ -Agonisten liegt in der guten oralen Bioverfügbarkeit und ZNS-Gängigkeit der Substanz. Dabei zeigt sich eine relativ lange Halbwertszeit der Substanz im Gehirngewebe von 23 h, sodass die Applikation nur einmal täglich erfolgen musste. Daten zu Spezifität und Pharmakokinetik der Substanz wurden von Sanofi übernommen und teilweise im Rahmen dieser Studie repliziert (siehe Abb. 2.1, S. 27, bzw. Abschnitt 3.2, S. 47)

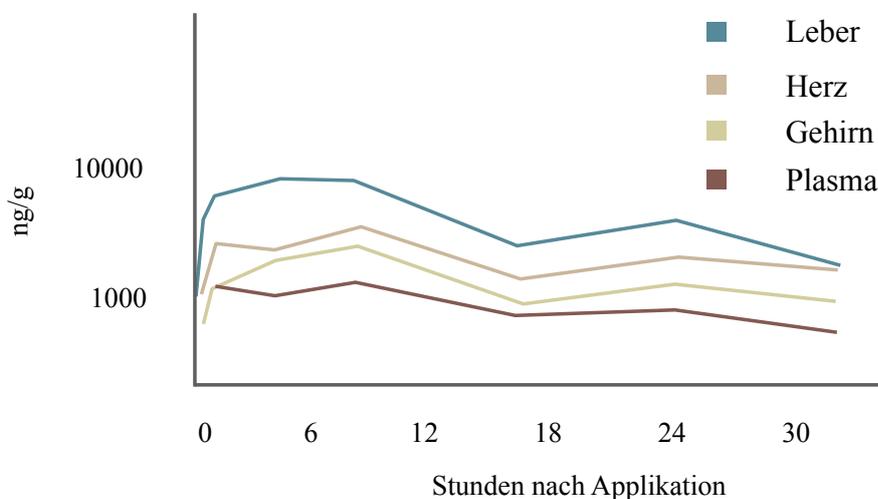


Abb. 2.1: Pharmakokinetik von SAR145

Dargestellt sind die Konzentrationen von SAR145 in verschiedenen Gewebetypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach oraler Gabe (gelöst in 0,6 % Methylcellulose/0,2 % Tween-80). Modifiziert nach Chandross, K., & Lindenschmidt, A. unveröffentlichte Daten.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Methoden

Alle Tierversuche wurden in den in-vivo- und Verhaltenslaboratorien der Abteilung für Experimentelle Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

2.2.1.1 Randomisierung und Verblindung

Sämtliche tierexperimentellen Versuche wurden randomisiert durchgeführt. Dazu wurden mit einem Smartphone-Programm (random.org Version 1.0-1.1) auf Grundlage von atmosphärischem Rauschen zufällig $n = \text{Anzahl der zu operierenden Tiere}$ Nummern gezogen und die vorher markierten Tiere in dieser Reihenfolge operiert. Durch erneutes Ziehen von $\frac{n}{2}$ Zahlen wurden die Tiere einer Behandlungsgruppe zugeordnet. Sämtliche Datenanalysen wurden verblindet für die Zugehörigkeit der Tiere zu einer Behandlungsgruppe durchgeführt. Dazu wurden für die Analyse des Schlaganfallvolumens Verblindungsnummern erstellt und diese von einer zweiten Person zufällig den Tiernummern des Versuchs zugeordnet. Für die Verhaltensexperimente und die Versuche mit Knock-out-Tieren war der Untersucher für die Dauer des gesamten Experiments für die Zugehörigkeit der Tiernummern zu den unterschiedlichen Behandlungsgruppen verblindet.

2.2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Versuche eingeschlossen wurden alle für diese Studie gelieferten, gesunden Tiere. Tiere, die offensichtliche Anomalien, wie makroskopisch sichtbare Tumore oder einen Wasserkopf zeigten, wurden nicht operiert, sondern euthanasiert.

Sämtliche operierten und damit am Experiment beteiligten Tiere, die keines der folgenden Ausschlusskriterien erfüllten, wurden in die Datenanalysen einbezogen. Ausschlusskriterien für am Experiment beteiligte Tiere waren

- Tod innerhalb der ersten 12 h postoperativ
- Unter dem Mikroskop kein sichtbar demarkiertes Infarktareal in den gefärbten histologischen Schnitten
- Nicht beobachteter Tod des Tieres und damit unbestimmbarer Todeszeitpunkt.
- Tod vor Abschluss des Experiments nach 28 Tagen (nur Verhaltensexperimente)

Stirbt ein Tier direkt postoperativ, ist davon auszugehen, dass dieser Tod nicht auf die zerebrale Ischämie, sondern auf operationsbedingte Komplikationen zurückzuführen ist. Da jedoch der Einfluss des Agonisten auf die zerebrale Ischämie untersucht werden sollte, wurden diese Tiere ausgeschlossen.

Die Variabilität der zerebralen Blutversorgung bei C57BL/6 Mäusen ist stark ausgeprägt. Dadurch bedingt zeigt sich bei Anwendung der Filament-Methode der proximalen MCAo eine relativ hohe Varianz. Wenn der Faden nicht vor dem Abgang der MCA zu liegen kommt, oder

eine sehr starke Kollateralversorgung des Versorgungsgebiets der MCA vorliegt, kann es auch zu gänzlichem Versagen der Okklusion kommen. Da in diesen Fällen keine zerebrale Ischämie vorlag, wurden betroffene Tiere ebenfalls aus den Analysen ausgeschlossen.

Stirbt ein Tier zu einem nicht bestimmtem Zeitpunkt (z. B. im Verlauf der Nacht) ist das Ausmaß der postmortalen autolytischen Prozesse und der Einfluss auf die histologisch bestimmte Infarktgröße nicht abzuschätzen, sodass auch diese Tiere ausgeschlossen werden mussten.

Tiere, die aufgrund des Vorliegens von Abbruchkriterien (S. 33) getötet werden mussten, wurden in die Datenanalysen eingeschlossen.

Sowohl die Anzahl der am Experiment beteiligten, als auch die Anzahl der in die Datenanalyse eingeschlossenen Tiere und die jeweiligen Ausschlusskriterien für nicht eingeschlossene Tiere sind im Ergebnisteil Abschnitt 3 dokumentiert.

2.2.1.3 Präparation und Applikation des Liganden

Da SAR145 sehr hydrophobe Eigenschaften aufweist, wurde der Ligand als Suspension oral per Gavage verabreicht. Der Ligand wurde dazu mithilfe eines Teflon Gewebemörser (Sigma-Aldrich) zerkleinert und in der Vehikellösung (0,6 % Methylcellulose (Sigma-Aldrich)/0,5 % Tween-80 (Sigma-Aldrich) in aqua destillata) suspendiert. Es wurden jeweils 0,1 ml mittels einer 22 Gauge Gavagekanüle appliziert. Dazu wurden die Tiere ohne vorherige Narkose mithilfe des Nackengriffs fixiert und die Substanz/das Vehikel über die Gavagekanüle direkt in den Magen appliziert. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die applizierten Substanzen von den Tieren sicher aufgenommen wurden.

2.2.1.4 Bestimmung der Konzentration von SAR145 im Zielgewebe

Um die Konzentration des Liganden im Zielgewebe nach oraler Gabe zu bestimmen, wurde drei Wildtyp-Tieren über 7 Tage einmal täglich der Ligand über orale Gavage (siehe 2.2.1.3, S. 29) appliziert. Die Tiere wurden getötet und transkardial mit NaCl perfundiert. Die Gehirne wurden wie unter 2.2.1.9 (S. 36) beschrieben asserviert und bei -20 °C aufbewahrt.

Transkardiale Perfusion

Um massenspektrometrische Analysen der Hirnsubstanz zur Bestimmung der Konzentration von SAR145 zu ermöglichen, wurde das Blut durch eine Perfusion mit NaCl aus dem Hirngewebe entfernt. Dazu wurden die Tiere in tiefer Isoflurannarkose auf dem Rücken liegend auf einer Styroporplatte an allen vier Extremitäten fixiert. Daraufhin erfolgte die Präparation des

Peritoneums über einen medianen Hautschnitt über die gesamte Länge des Abdomens. Nach der folgenden Eröffnung des Peritoneums wurde das Zwerchfell durch eine Verlagerung der Leber nach kaudal dargestellt. Es folgte die vorsichtige Eröffnung des Zwerchfells. Unter Sicht und ohne Verletzung der thorakalen Organe wurden die Rippenbögen über die gesamte Thoraxlänge rechts und links möglichst weit dorsal durchtrennt und nach oben geschlagen. In das nun offenliegende schlagende Herz wurde apikal eine 21 Gauge Venofix® Sicherheitskanüle eingebracht. Nach Eröffnung des rechten Vorhofs wurde über die liegende 21-Gauge-Venofix®-Sicherheitskanüle mit ca. 20 ml NaCl Lösung perfundiert.

2.2.1.5 Mausmodell des ischämischen Schlaganfalls

Um bei den Tieren eine reproduzierbare fokale Läsion zu erzeugen, wurde das bei Mäusen etablierte Modell des Verschlusses der Arteria cerebri media (*middle cerebral artery occlusion*, MCAo)¹⁵⁵ gewählt. Dabei wurden die Vorgaben durch die internen *standard operating procedures* (SOP)¹⁵⁶ eingehalten. Bei dem verwendeten MCAo-Fadenmodell wird mittels eines in die linke Arteria carotis interna (ICA) eingebrachten Filaments eine transiente zerebrale Ischämie des linkseitigen Stromgebiets der Arteria cerebri media (MCA) für 45 min mit nachfolgender Perfusion erzeugt (45 min MCAo).

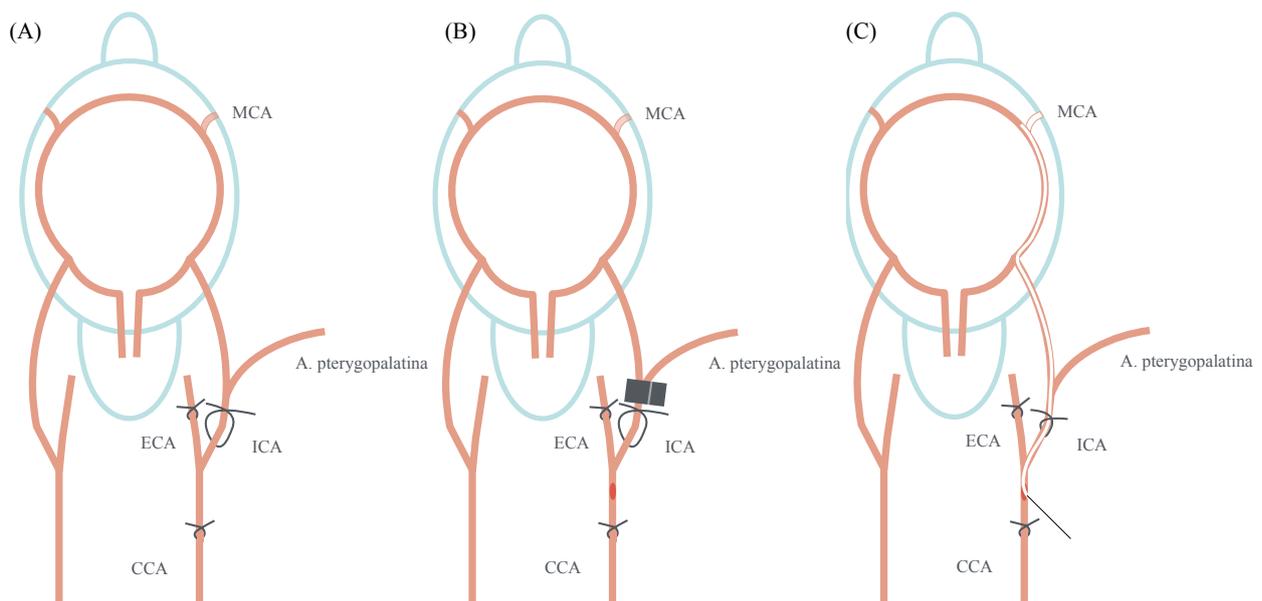


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der MCAo

Dargestellt sind drei Schritte der MCAo. **(A)** Zunächst werden permanente Ligaturen an CCA und ECA angelegt und eine Schlinge um die ICA vorbereitet. **(B)** Die ICA wird mit einem temporären Clip verschlossen und eine kleine Öffnung in die CCA geschnitten. **(C)** Durch diese Öffnung wird das Filament eingebracht, bis zum Abgang der MCA vorgeschoben und die Schlinge um die ICA festgezogen. Nach dem Entfernen des Filaments bleibt die Ligatur an der ICA dauerhaft verschlossen (nicht dargestellt). CCA = Arteria carotis communis, ECA = Arteria carotis externa, ICA = Arteria carotis interna, MCA = Arteria cerebri media.

Material und Methoden

Dazu wurden die Tiere am Tag der Operation einige Zeit vor Versuchsbeginn aus der Tierhaltung der Experimentellen Neurologie in das in-vivo-Labor transferiert, um eine möglichst gute Adaptation an die veränderten Umgebungsbedingungen zu ermöglichen. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere einzeln aus ihrem Käfig genommen, gewogen, markiert und die Operationsreihenfolge und Gruppenzugehörigkeit wie unter 2.2.1.1 (S. 28) beschrieben festgelegt.

Zur Einleitung der Narkose wurde ein Gasgemisch aus 2,5 % Isofluran (Abbot), 70 % Distickstoffmonoxid (Lachgas) und 30 % Sauerstoff genutzt. Die Tiere wurden in eine 50 ml Perfusorspritze (B. Braun) eingelegt, die an den Schlauch des Isofluranvaporisators (Dräger) angeschlossen wurde. Nach Einleitung der Narkose wurden die Tiere aus der Spritze entnommen und in dem stereotaktischen Rahmen (David Kopf) auf einer Heizplatte (Fine Science Tools) in Rückenlage fixiert. Um eine optimale Temperatur der Tiere von $37,5\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ während des gesamten Operationszeitraums zu gewährleisten, wurde die Heizplatte über eine rektale Temperatursonde rückgekoppelt. Der Operationsbereich wurde daraufhin mit Octenisept (Schülke & Mayr) desinfiziert, jedoch nicht rasiert um Mikroläsionen an der Haut zu vermeiden. Der Zugang zu den Gefäßen erfolgt über einen medianen Hautschnitt und stumpfer Präparation mittels zweier Pinzetten (Fine Science Tools) um die linke Arteria carotis communis (CCA), Arteria carotis externa (ECA), die ICA sowie die Karotisbifurkation darzustellen. Vorsichtig wurde die linke CCA von dem kranial des Gefäßes verlaufenden Nervus vagus stumpf getrennt und das Gefäß mittels eines 7-0 Seidenfadens (Feuerstein) möglichst weit proximal der Bifurkation ligiert. Ebenso wurde auch die ECA stumpf freipräpariert und distal der Bifurkation ligiert. Um die ICA wurde ein 5-0 Seidenfaden (Feuerstein) gelegt und ein Knoten vorbereitet, der jedoch noch nicht zugezogen wurde. Bevor die ICA mittels des mikrovaskulären Gefäßclips (S&T) temporär verschlossen wurde, musste eine gute Übersicht über den weiteren Verlauf der ICA und die Abzweigung der Arteria pterygopalatina sichergestellt werden. Daraufhin wurden beide Gefäße mittels des Clips verschlossen und die CCA mithilfe der Vannas Federschere (Fine Science Tools) distal der Gefäßligatur, aber proximal der Bifurkation eingeschnitten. Das Monofilament (Docol Corp.) wurde vorsichtig in das Lumen eingeführt und bis zum Clip vorgeschoben. Um den Blutverlust zu minimieren, wurde nun die lockere Ligatur um die ICA soweit zugezogen, dass das Filament noch gut beweglich war, die Blutung jedoch gestoppt wurde. Der Clip wurde entfernt und das Filament unter Sicht an der Abzweigung der Arteria pterygopalatina vorbei weiter in die ICA vorgeschoben bis der mit Silikon überzogene Anteil des Filaments komplett intraluminal lag und sich das Ligament nicht weiter vorschieben ließ. Die Ligatur der ICA wurde nun zugezogen, um das Filament in seiner Position zu fixieren. Das

Filament kam so im A1-Segment der Arteria cerebri anterior zu liegen und verschloss das M1-Segment der MCA und die Arteriae choroides anteriores. Der Fluss in der Arteria cerebri anterior war durch die Arteria communicans anterior jedoch weiter gewährleistet.

Die Wunde wurde daraufhin vorübergehend mit zwei Einzelnähten verschlossen und die Tiere für die Zeit des Gefäßverschlusses von 45 min in eine Aufwachbox (Peco Services) mit konstant 30 °C transferiert. Anschließend wurden die Tiere erneut wie oben beschrieben narkotisiert, die 5-0 Ligatur der ICA geöffnet, das Filament entfernt und direkt wieder verschlossen, um den Blutverlust aus der Inzision zu minimieren. Die Wunde wurde nun mit drei Einzelnähten versorgt und lokal Bupivacain 1 % (Apotheke Charité) appliziert, um den postoperativen Wundschmerz zu lindern. Als *scheinoperiert* werden Tiere bezeichnet, die derselben Prozedur unterzogen werden, wobei jedoch durch sofortiges Wiederentfernen des Filaments keine zerebrale Ischämie induziert wird.

2.2.1.6 Postoperative Versorgung der Versuchstiere und Abbruchkriterien

Durch die postoperative Versorgung der Tiere soll die Belastung so gering wie möglich gehalten und die postoperative Mortalität gesenkt werden. Nach jeder operativen Maßnahme wurden die Tiere nach Wundverschluss und lokaler Analgesie in eine Aufwachbox mit konstant 30 °C transferiert (Peco Services). Sobald die Tiere vollständig aus der Narkose erwacht waren und sich frei bewegten, frühestens jedoch nach zwei Stunden, wurden sie in ihren ursprünglichen Käfig zurückgesetzt. Um einem Gewichtsverlust vorzubeugen, hatten die Tiere postoperativ ebenerdigen Zugang zu aufgeweichter Nahrung und einen durch einen verlängerten Trinkansatz vereinfachten Zugang zu Flüssigkeit. Die Tiere wurden täglich visitiert, gewogen und auf Abbruchkriterien untersucht. Da die Tiere insbesondere in den ersten Tagen nach MCAo nur sehr wenig Flüssigkeit zu sich nahmen, wurde den Tieren täglich 0,5 ml NaCl intraperitoneal injiziert. Zur Einschätzung des funktionellen Defizits diente der nach Bederson et al.¹⁵⁷ modifizierte Test. Diese ursprünglich für das postoperative Scoring von Ratten nach MCAo entwickelte Untersuchung hat sich mittlerweile auch als robuste Methode zur groben Einschätzung des funktionellen Defizits von Mäusen nach MCAo etabliert. Dabei werden 0 Punkte für ein fehlendes Defizit und 3 Punkte für ein schweres Defizit vergeben. Nach Anheben der Mäuse am Schwanz wird deren motorische Reaktion beobachtet. Die nur einseitige Flexion der vorderen Extremität entspricht einem leichten Defizit und es wird ein Punkt vergeben. Wird die Maus zurück auf den Boden gesetzt und beginnt daraufhin aufgrund der Hemiparese, sich nur zirkulär in eine Richtung fortzubewegen, werden zwei Punkte vergeben. Führt das

zusätzliche leichte seitliche Anstoßen zum Umfallen des Tiers entspricht dies einem schweren Defizit und damit 3 Punkten.

Tiere mit schwerem Defizit oder die eines der folgenden Kriterien aufwiesen, wurden gemäß der im Tierversuchsantrag definierten Abbruchkriterien umgehend schmerzfrei und unter Vollnarkose getötet.

- Gewichtsverlust von mehr als 20 % des präoperativ bestimmten Körpergewichts
- Durch Schlaganfall bedingte starke Bewegungslosigkeit (entspricht mindestens einem score von 3 Punkten, s.o.)
- Offensichtliche Schmerzen
- Prolongierte Apathie oder Nahrungsverweigerung (d. h. länger als 24 h nach MCAo anhaltend)
- Wiederholt große epileptische Anfälle

Alle Auffälligkeiten wurden dokumentiert und falls ein Abbruchkriterium erfüllt war gemäß der „Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere“¹⁵⁸ verfahren.

2.2.1.7 Laser-Doppler-Flussmessung

Die Laser-Doppler-Flussmessung gilt als etabliertes semiquantitatives Verfahren, um die Reduktion der Durchblutung im Hirngewebe ohne Öffnung der Kalotte zu bestimmen. Dazu wurde das Tier wie oben beschrieben narkotisiert und in Bauchlage im stereotaktischen Rahmen (David Kopf) fixiert. Über einen medianen Hautschnitt am Schädel wurde die Sutura coronalis und die Sutura sagitalis dargestellt. Eine fiberoptische Sonde (Perimed) wurde 2 mm posterior und 5 mm lateral des Bregmas mit Zweikomponentenkleber fixiert und mithilfe des Adapters (Perimed) mit dem Laser-Doppler-Flußmessgerät (Perimed) verbunden. Um eine Hypothermie des Gehirns zu vermeiden, wurde die Haut daraufhin wieder bestmöglich über die Kalotte gelegt und fixiert. Anschließend wurde bei den Tieren unter kontinuierlicher Messung des Flusses durch den mit dem Laser-Doppler-Flussmessgerät verbundenen Laptop und der Software Perisoft (Perimed) eine MCAo wie oben beschrieben (siehe 2.2.1.5, S. 30) durchgeführt.

2.2.1.8 Verhaltensanalysen

Sämtliche Verhaltensanalysen wurden im Verhaltenslabor der Experimentellen Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Da es sich bei Mäusen um nachtaktive Nager handelt, wurde zur Durchführung der Tests ein Zeitraum am späten Nachmittag und frühen Abend (16-19 Uhr) gewählt und für alle Tests eingehalten.

CatWalk

Der *CatWalk* (Noldus) ist ein erst seit einigen Jahren verfügbares System zur quantifizierbaren Gang- und Bewegungsanalyse von Nagern. Ursprünglich an Ratten mit Rückenmarksläsion entwickelt, ist es mittlerweile auch für die Verhaltensanalyse bei Mäusen nach einem Schlaganfall etabliert.^{159,160} Das CatWalk System besteht aus einem 1,3 m langen und 5 cm breiten Korridor mit einem Glasboden. Der Glasboden wird seitlich mit grünem Licht so illuminiert, dass das Licht intern reflektiert wird. Berühren jedoch die Pfoten des Tiers das Glas, so wird an dieser Stelle das grüne Licht gestreut und von unten mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet. Mithilfe der CatWalk XT Software (Noldus) können die so gewonnen Gang- und Bewegungsmuster auf verschiedene Parameter analysiert werden. Vor der Induktion des Schlaganfalls wurden die Tiere an vier aufeinanderfolgenden Tagen an das System gewöhnt und ein Ausgangswert aufgezeichnet. Dazu wurde der Heimatkäfig an einem Ende des Ganges platziert und die Maus an das andere gesetzt, um den Tieren einen Anreiz für eine möglichst unterbrechungsfreie, d. h. erfolgreiche Passage des Korridors zu bieten. Wenn die Tiere trotzdem anhielten, die Geschwindigkeitsvariation über 60 % oder die Maximalgeschwindigkeit über 400 mm/s lag, wurde der Durchgang verworfen. Sowohl für den Ausgangswert als auch für alle weiteren Messzeitpunkte wurden pro Tiere drei erfolgreiche Durchgänge gefordert. Zur statistischen Auswertung wurde jeweils der Mittelwert der drei Durchgänge herangezogen. Um die Vorteile der neuen Software CatWalk XT 10.0 zu nutzen, die jedoch mit dem verwendeten Hardware System nicht kompatibel war, wurden alle Daten mit CatWalk XT 8.1 aufgezeichnet, die Analyse der Daten jedoch an CatWalk XT 10.0 durchgeführt.

Pole Test

Beim Pole Test handelt es sich um einen etablierten Test zur Evaluation von Bewegungseinschränkungen bei Mäusen.¹⁶¹ Auch nach MCAo zeigte sich der Test bei Mäusen als geeignet, um zwischen scheinoperierten Tieren und MCAo Tieren zu unterscheiden^{150,162} und auch neuroprotektive Effekte nachzuweisen.¹⁶³ Für die nachgewiesene Bewegungsstörung ist wahrscheinlich eine striatale Beteiligung ausschlaggebend, da sich der Pole Test in einem distalen MCAo-Modell mit reinem kortikalen Schaden nicht als nützlich erwies.^{164,165} Der Aufbau des Pole Tests besteht aus einer vertikalen, ca. 55 cm langen und 8-10 mm dicken Metallstange, die in einem Käfig mit reichlich Streu steht und mit Klebeband umwickelt ist, um eine raue Oberfläche zu bieten. Alle Durchläufe wurden per Videokamera (Toshiba)

aufgezeichnet und im Nachhinein mit Avidemux (MEAN) analysiert. Zu Beginn jedes Durchlaufs wurden die Tiere mit der Schnauze nach oben an das obere Ende der Stange gesetzt. Sobald das Tier begann, sich umzuwenden, um die Stange herunterzuklettern, wurde die Messung gestartet. Erhoben wurde die Zeit, die das Tier benötigte, um sich vollständig umzuwenden (T Turn) und die Zeit, bis das Tier den Boden erreichte (T Down). Wenn sich das Tier nicht vollständig mit der Schnauze nach unten drehte, sondern seitlich hinunterkletterte, wurde T Down = T Turn gesetzt. Fiel das Tier oder hielt es in der Abwärtsbewegung inne, wurde der Durchlauf nicht gewertet. Um ein Überklettern der Stangenspitze anstelle der Drehbewegung zu verhindern wurde an die Spitze der Stange eine 7 x 7 cm große Pappe angebracht. Vor dem Durchführen der MCAo wurden die Tiere an vier aufeinanderfolgenden Tagen trainiert und am vierten Tag ein Ausgangswert aufgezeichnet. Für jeden Messzeitpunkt wurden pro Tier vier Durchläufe aufgezeichnet deren Mittelwert zur statistischen Analyse herangezogen wurde.

RotaRod

Das RotaRod (TSE Systems) ist eines der Standardverfahren zur Messung motorischer Funktionen bei Mäusen nach zerebraler Ischämie. Der Test wurde zunächst an Ratten beschrieben¹⁶⁶ später jedoch auch für Mäuse eingeführt¹⁶⁷ und mehrfach in Modellen zerebraler Ischämie getestet.^{160,168,169} Der Versuchsaufbau besteht aus einem rotierenden Stab (30 mm Durchmesser) der in einer Höhe von 15 cm in einem Kasten montiert und durch dünne Zwischenwände in mehrere Kompartimente unterteilt ist, um gleichzeitig mehrere Tiere testen zu können. Die Mäuse werden auf diesen Stab gesetzt und beginnen zu laufen, um sich auf dem innerhalb von 300 Sekunden von 4 auf 40 Umdrehungen pro Minute beschleunigenden Stab zu halten. Die Zeit, bis die Maus herunterfällt, wurde pro Messzeitpunkt in drei Durchgängen ermittelt und der Mittelwert in der Analyse verwendet. Zwischen den einzelnen Durchgängen ruhten die Tiere für jeweils 15 min. Da die Leistung auf dem RotaRod stark abhängig von Training und Motivation ist, wurden die Tiere vor der MCAo an vier aufeinanderfolgenden Tagen in jeweils drei Durchgängen trainiert und am letzten Tag eine Ausgangsleistung ermittelt.

Corner Test

Der Corner Test ist ein an Ratten entwickelter Test, um ein sensomotorisches Defizit nachzuweisen^{170,171} und wurde bereits für den Nachweis funktioneller Defizite bei Mäusen nach fokaler zerebraler Ischämie etabliert.¹⁷² Wie auch der Pole Test, zeigte sich der Corner Test jedoch bei reinen kortikalen Schadensmodellen nicht als nützlich.^{165,173,174} Daher ist anzunehmen, dass der Corner Test wie auch der Pole Test ein Maß für den striatalen Schaden

darstellt. Der Versuchsaufbau besteht aus vier 30 x 30 cm messenden Pappplatten. Jeweils zwei werden mit einem Eckwinkel von 30° so verbunden, dass sich nach Zusammenfügen aller vier Platten eine rautenförmige „Arena“ ergibt. An den spitzwinkligen Ecken wird zwischen den beiden Platten ein Spalt gelassen, um den Tieren einen Anreiz zu bieten diese Ecken zu erkunden. Zu Beginn des Versuchs werden die Tiere in die Mitte der Arena gesetzt und laufen daraufhin typischerweise in eine der beiden spitzwinkligen Ecken. Werden durch Berühren der Platten in den Ecken die Schnurrhaare der Tiere stimuliert, richten sie sich auf und drehen sich nach links oder rechts um. Die Richtung der Umkehrbewegung wird registriert. Eine Umkehrbewegung ohne vorheriges Aufrichten wird nicht gewertet. Im Gegensatz zu Tieren nach zerebraler Ischämie zeigen gesunde Mäuse bezüglich der Richtung der Umkehrbewegung keine Tendenz zu einer Seite. Gemäß der verwendeten Formel für den Lateralitätsindex

$$LI = \frac{\text{Drehung link} - \text{Drehung rechts}}{\text{Drehung links} + \text{Drehung rechts}} \quad (1)$$

ergibt sich damit ein Wert von 0, wenn keine Seitenpräferenz besteht. Für jedes Tier wurden pro Untersuchungszeitpunkt 10 valide Umkehrbewegungen registriert. Wie auch das RotaRod ist der Corner Test jedoch stark von der Motivation und dem Zustand der Tiere abhängig, sodass die Tiere gerade in den ersten Tagen nach MCAo zu stark eingeschränkt sein können, um den Test regelhaft durchzuführen.

2.2.1.9 Schlaganfallvolumetrie

Zur Bestimmung des Schlaganfallvolumens wurden je nach Untersuchungszeitpunkt zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Nach der Tötung wurde an allen Tieren eine histologische Auswertung der Infarktgröße (siehe S. 36) durchgeführt. Zusätzlich wurde in der Langzeitbeobachtung zu mehreren Zeitpunkten eine MRT zur anschließenden Analyse der Infarktgröße benutzt (siehe S. 38).

Probengewinnung, Färbung und histologische Auswertung

Zum Tötungszeitpunkt wurden die Tiere in tiefer Isoflurannarkose dekapitiert und das Gehirn nach Eröffnung der Schädelkalotte entnommen. Die Proben wurden in -40 °C kaltem Methylbutan (Carl Roth) schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C zwischengelagert. Zur weiteren Analyse wurden pro Gehirn mithilfe des Kryostaten (Leica) 13 bis 14 20 µM dicke Schnitte in einem Kollektionsintervall von 600 µM gewonnen und auf Objektträger (R. Langenbrinck) aufgezogen. Es wurden pro Gehirn zwei solcher Sets gewonnen, wobei eines direkt mit Hämatoxylin gefärbt und das andere bei -20 °C kryofixiert wurde.

Material und Methoden

Um die Größe des infarzierten Areals zu untersuchen, wurden die Schnitte mit einer modifizierten Hämatoxylinfärbung nach Papanicolaou gefärbt. Dazu wurde folgendes im Labor etablierte Protokoll dem *minimum standard of performance* (MSOP) entsprechend angewandt:

- Entwässern der Schnitte mit 100 % Ethanol *10 min*
- Spülen in Aqua destillata *4 Sekunden*
- Färben mit Hämatoxylin nach Papanicolaou (Merck Millipore) *5 min*
- Spülen in Aqua destillata *10 Sekunden*
- Spülen in HCl – Alkohol (2 ml 25 % HCl/ 200 ml 100 % Ethanol) 2 x kurz
- Spülen in Aqua destillata *4 Sekunden*
- Bläuen in Leitungswasser *2 – 3 min*
- Spülen in Aqua destillata *4 Sekunden*
- Entwässern mit aufsteigender Alkoholreihe (70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100 % Ethanol) *à 5 Sekunden*
- Fixieren mit 2 x Rotihistol® *à 10 min*
- Eindecken der Schnitte in Vitroclud®

Diese Färbung stellt vornehmlich saure Strukturen, wie z. B. die DNA im Zellkern, blau dar, während basische Gewebeanteile nicht angefärbt werden. Dadurch erscheinen die hypoxisch geschädigten Bereich blass, da sich dort nur noch wenige intakte Zellkerne befinden, und grenzen sich so scharf gegen das dunkle nichtinfarzierte Gewebe ab. Die Vermessung des Infarktareals erfolgte mithilfe eines kameragestützten Computersystems. Dazu wurden die Schnitte auf dem Leuchttisch (InterFocus Imaging) durch eine Kamera (Photometrics) digitalisiert und am Computer manuell jeweils die ipsilaterale Hemisphäre, die kontralaterale Hemisphäre und das Infarktareale markiert. Durch eine vorherige Kalibrierung und die Eingabe von Kollektionsintervall und Schnittdicke konnten mithilfe der MCID Software (Interfocus) die einzelnen Volumina berechnet werden.

Unter fokaler Ischämie kommt es zu einer ödematösen Schwellung des Hirngewebes mit einem Maximum des Ödems 72 h nach dem Infarkt. Um die tatsächliche Größe des infarzierten Gewebes zu bestimmen, muss die gemessene Infarktgröße für dieses Ödem korrigiert werden. In Anlehnung an die Methode von Lin et al.¹⁷⁵ wurde das korrigierte Infarktvolumen als Prozentsatz der kontralateralen Hemisphäre nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Ödem} = \text{ipsilaterale Hemisphere} - \text{contralaterale Hemisphere} \quad (2)$$

$$\text{Infarkt} (\% \text{ contralaterale Hemisphere}) = 100 * \frac{\text{Infarkt} - \text{Ödem}}{\text{contralaterale Hemisphere}} \quad (3)$$

Für sämtliche Auswertungen wurde ausschließlich das auf diese Weise bestimmte, korrigierte Infarktvolumen verwendet.

MRT-gestützte Infarktvolumetrie

Die MRT-gestützte Infarktvolumetrie wurde an einem 7 Tesla Kleintier-MRT (Bruker) durchgeführt und die Bilder mit Paravision 4.0 (Bruker) aufgenommen und verarbeitet. Das Gerät besitzt einen 16 cm horizontal gebohrten Magneten und einen 9 cm (im inneren Durchmesser) messenden abgeschirmten Gradienten mit einer H-Resonanzfrequenz von 300 MHz und einer maximalen Gradientenfeldstärke von 300 mT/m. Zur Bildgewinnung wurde ein H-RF-quadratur-Resonator mit einem inneren Durchmesser von 20 mm genutzt. Für die Untersuchung wurden die Tiere mit einem Narkosegemisch aus 2,5 % Isofluran, 70 % Stickstoff und 30 % Sauerstoff narkotisiert und die Narkose per Maskenbeatmung mit einem Gemisch aus 1,5 % Isofluran, 70 % Stickstoff und 30 % Sauerstoff aufrechterhalten. Die Körpertemperatur und Respiration der Tiere wurde über den gesamten Untersuchungszeitraum computergestützt überwacht und die Temperatur mit einer mit warmem Wasser durchspülten Wärmematte (Medizinisch-Technische Labore) bei 37 °C gehalten. Um auch zu späteren Zeitpunkten eine verlässliche Demarkierung des Infarktareals zu gewährleisten, wurde für die Infarktvolumetrie eine Karte der T2-Relaxationszeiten mithilfe der echo-train multi-slice-multi-echo (MSME) Sequenz (T2 MSME; TR = 2500 ms/16 Echos mit TE = 10 ms, Matrix = 256 x 256, FOV = 2,56 x 2,56 cm, Schichtdicke = 1 mm, 8 Schnitte im Bereich zwischen Bulbus olfactorius und Kleinhirn, Dauer gesamt 8 min) erstellt. Für die Konvertierung der T2-Karten in visuell auswertbare Bilder wurde ImageJ (National Institutes of Health) verwendet. Die Größen der ipsilateralen und contralateralen Hemisphäre und des infarzierten Areals wurden mithilfe von Analyze 10.0 (AnalyzeDirect) gemessen. Dazu wurde mithilfe eines „*region of interest*“-Werkzeugs ein bestimmter Wertebereich gewählt und alle Pixel innerhalb dieses Wertebereichs um einen definierten Ausgangspixel verbunden. Durch Definition des passenden Wertebereichs und Ausgangspixels konnte so halbautomatisch die gewünschten Regionen markiert und berechnet werden. Die prozentuale Infarktgröße ergab sich für die Messung vier Tage nach MCAo nach Formel (2) und (3) (S. 37). Da zu späteren Zeitpunkten keine Schwellung mehr vorliegt und für resorptive Prozesse korrigiert werden muss, ergab sich für die Zeitpunkte 10 und 28 Tage nach MCAo das korrigierte prozentuale Infarktvolumen nach:

$$\text{korrigierter Infarkt} = \text{Infarkt} + (\text{contralaterale Hemisphäre} - \text{ipsilaterale Hemisphäre}) \quad (4)$$

$$\text{Infarkt} (\% \text{ contralaterale Hemisphäre}) = 100 * \frac{\text{korrigierter Infarkt}}{\text{contralaterale Hemisphäre}} \quad (5)$$

Experimentelle Protokolle der in-vivo-Experimente

Die Versuchsplanung folgte den aktuellen Empfehlungen des *Stroke Treatment Academic Industry Roundtable* (STAIR).^{153,154} Dementsprechend wurde zunächst in einer Dosiswirkungskurve die effektivste Dosis des Liganden bestimmt. Im Anschluss wurde in einer Zeitfensterstudie der optimale Zeitpunkt für die Behandlung definiert. Es wurden sowohl morphologische als auch funktionelle Messwerte erhoben, um das Maß einer möglichen Neuroprotektion in der akuten Phase und in der Langzeitbeobachtung zu quantifizieren. Da bereits Daten zu Experimenten in einem permanenten MCAo-Modell vorlagen, wurde ein transientes Modell der MCAo gewählt. Um die Spezifität einer möglichen neuroprotektiven Wirkung zu untersuchen, wurden zusätzlich Versuche an PPAR δ -Knock-out-Tieren durchgeführt.

1. Untersuchung des neuroprotektiven Potentials von SAR145 bei der fokalen zerebralen Ischämie in Wildtyp-Tieren
 - a. Dosisfindungsstudie: Um den therapeutischen Bereich und die effektivste Dosis für eine Behandlung mit SAR145 zum Zeitpunkt der Reperfusion zu bestimmen, wurde Wildtyp-Tieren nach 45 min MCAo der PPAR δ -Ligand in den Konzentrationen 1 mg/kg KG, 10 mg/kg KG, 30 mg/kg KG oder 100 mg/kg KG (Verumgruppen) oder Vehikel (Vehikelgruppe) zum Zeitpunkt der Reperfusion gegeben. Die Tiere wurden nach 72 h getötet, die Hirne entnommen und wie oben beschrieben (S. 36) ausgewertet.
 - b. Zeitfensterstudie: In einem zweiten Schritt sollte das Zeitfenster bestimmt werden in dem SAR145 wirksam ist. Dazu wurde die wirksamste Dosis aus Studie 1a mit Latenzen von 3, 6, 12 oder 24 h nach MCAo (45 min Verschlusszeit) gegeben.
2. Untersuchung des neuroprotektiven Potentials von SAR145 bei der fokalen zerebralen Ischämie in PPAR δ -Knock-out-Tieren. Um die PPAR δ -spezifische neuroprotektive Wirkung von SAR145 nachzuweisen, wurden PPAR δ -Knock-out-Tiere nach 45 min MCAo in der wirksamsten Dosis aus 1a zum Zeitpunkt der Reperfusion mit SAR145 oder Vehikel behandelt, nach 72 h getötet, die Hirne entnommen und wie oben beschrieben (S. 36) ausgewertet.

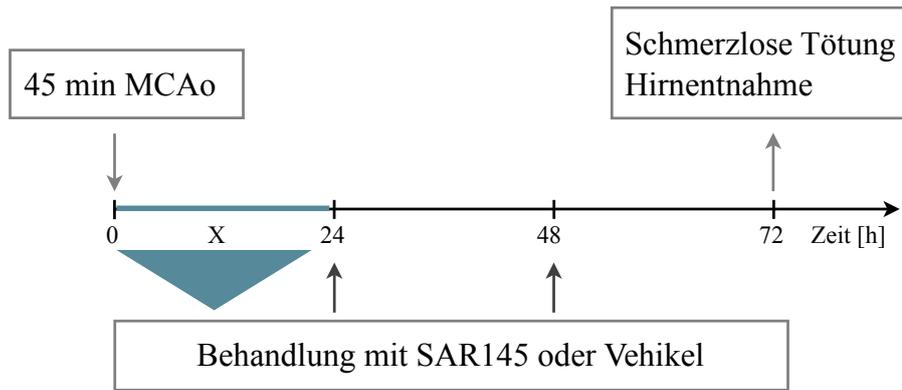


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Versuche 1a/b und 2

Die Tiere wurden für das Experiment 1a zum Zeitpunkt X = 0 h nach Reperfusion mit SAR145 in den Dosierungen 1, 10, 30 oder 100 mg/kg KG oder Vehikel behandelt. Für Experiment 1b wurde der Ligand stets in der Dosis 10 mg/kg KG zu den Zeitpunkten X = 0, 3, 6, 12 und 24 h gegeben. Türkis: Zeitfenster der initialen Behandlung für 1b. Schwarze Pfeile: folgende tägliche Behandlung mit SAR145.

3. Untersuchung des funktionellen Endergebnisses und Langzeitbeobachtung. Um den Effekt von SAR145 auf das funktionelle Endergebnis zu untersuchen, wurden Wildtyp-Tiere nach 45 min MCAo mit SAR145 in der wirksamsten Dosis aus Experiment 1a zum **spätesten** effektiven Zeitpunkt aus 1b mit SAR145 oder Vehikel behandelt. Die Behandlung wurde über 28 Tage einmal täglich fortgeführt. Um das funktionelle und morphologische Ergebnis zu beurteilen, wurden die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten mithilfe einer Serie von Verhaltenstests und MRT untersucht. Für das genaue Design des Experiments siehe Abb. 2.4 (S. 40).

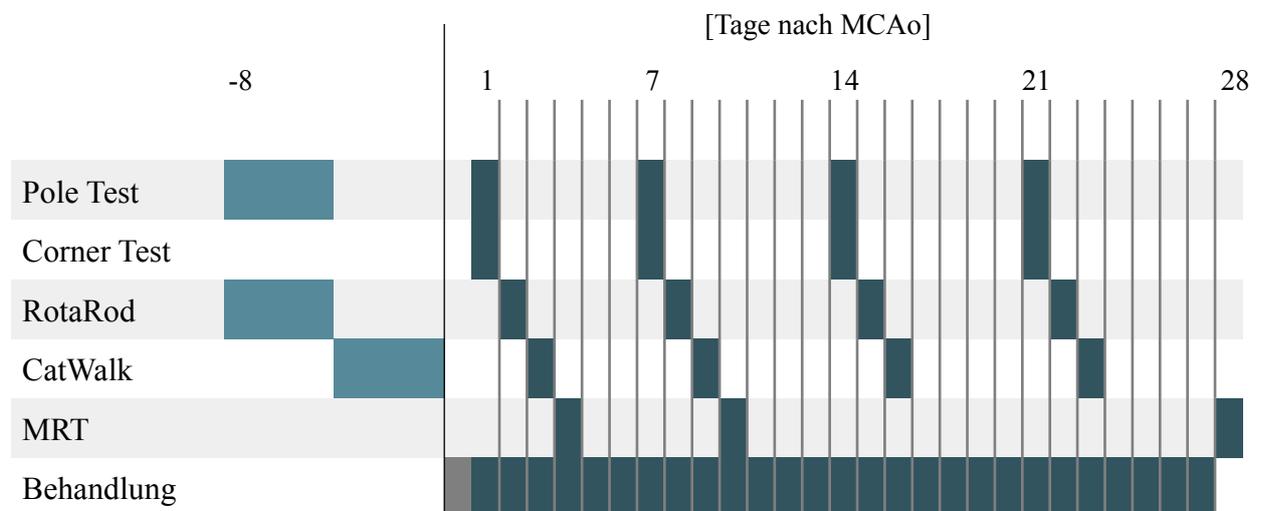


Abb. 2.4: Zeitpunkte der Durchführung der Verhaltenstests und der MRT Untersuchung

Mit SAR145 oder Vehikel behandelte Tiere (10 Tiere/Gruppe) wurden an den Tagen 1, 7, 14 und 21 nach 45 min MCAo der Pole Test und der Corner Test, an den Tagen 2, 8, 15 und 22 das RotaRod, an den Tagen 3, 9, 16 und 23 der CatWalk und an den Tagen 4, 10 und 28 eine MRT durchgeführt. Die Tiere wurden während des gesamten Untersuchungszeitraums nach MCAo täglich mit SAR145 bzw. Vehikel behandelt. Hellblau markiert sind die Trainingstage.

Berechnung der Stichprobengröße

Ausgehend von den bisher berichteten Effekten wurde von einer Reduktion der Infarktgröße von 30 % ausgegangen. Zur Bestimmung der Gruppengrößen wurde eine Standardabweichung von 25 % angenommen und eine Power ($1-\beta$) von 0,8 angestrebt. Es wurde eine α -Fehler Wahrscheinlichkeit von $\alpha = .05$ akzeptiert.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten an Zellkulturen oder zu deren Gewinnung wurden im Zellkulturlabor der Experimentellen Neurologie der Charité durchgeführt. Dabei wurden die SOPs der Abteilung zum sterilen Arbeiten und zum Arbeiten in der Zellkultur angewandt.

2.2.2.1 Isolierung von primären Mikrogliazellen

Für die Isolierung primärer Mausmikrogliazellen wurden pro Präparation 8-12 C57BL/6 Wildtyp-Mäuse im Alter von drei Tagen postnatal verwendet. Die Tiere wurden über die Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité bestellt, am Tag der Präparation ohne Mutter im Wärmebett geliefert und sofort weiterverarbeitet. Die Tiere wurden dekapitiert und die Köpfe in einer Petrischale mit *phosphate buffer solution* (PBS) in den sterilen Arbeitsraum unter die Abzugshaube gebracht. Nachdem die Gehirne aus dem Schädel präpariert und in eine neue Petrischale mit PBS transferiert waren, wurde unter einem Mikroskop (Leica) das Kleinhirn, das Mittelhirn und die Meningen entfernt. Die so gewonnenen Hemisphären wurden in einem neuen Gefäß bei 37 °C mit 2 ml Trypsin (1:250, 2,5 %, Biochrom) für 15 min inkubiert. Durch mechanische Lyse mithilfe einer Glaspipette wurden die Gehirne homogenisiert und nach Zugabe von 7 ml Mikroglia-Medium (S. 22) je nach Anzahl der benutzten Tiere auf 6-8 Zellkulturflaschen (75 cm³) verteilt und über Nacht bei 36,5 °C und 5 % CO₂ in den Inkubator (Binder) gestellt.

Am nächsten Tag wurde das Medium gegen 10 ml neues Medium getauscht und für weitere zwei Tage im Inkubator belassen. Daraufhin wurde das Medium gegen Medium mit Wachstumsfaktoren (GM-CSF & M-CSF, eBioscience) getauscht und für weitere vier Tage inkubiert. Die Zellen wurden dann geerntet und in Mikrotiterplatten mit 48 Kavitäten zu 200000 Zellen pro Kavität ausgesät. Damit sich die Zellen absetzen konnten, wurden sie weitere 48 h inkubiert, bevor mit dem Versuch begonnen wurde.

2.2.2.2 Messung der Inhibition der Mikrogliaaktivierung

Um den Mechanismus einer möglichen Neuroprotektion durch die Aktivierung des PPAR δ zu untersuchen, wurden primäre Mausmikrogliazellen mit SAR145 in verschiedenen Konzentrationen oder Vehikeln inkubiert, daraufhin stimuliert, und die Menge der NO-Ausschüttung mithilfe des Griess-Tests als Maß der Mikrogliaaktivierung gemessen.¹⁴¹

Um auszuschließen, dass rein toxische Effekte zu einer verminderten Aktivität der Mikroglia geführt haben könnten, wurde danach der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid (MTT)-Test als Maß für die Zellviabilität benutzt.

Mikrogliazellen wurden wie unter 2.2.2.1 (S. 41) beschrieben isoliert und für 24 h mit SAR145 gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) in den Konzentrationen 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M oder DMSO (in der höchsten zur Lösung der Substanz verwendeten Konzentration) inkubiert. Die Stimulation erfolgte durch Inkubation der Zellen für weitere 48 h mit bakteriellen Endotoxin Lipopolysacchariden (LPS) in einer Konzentration von 100 ng/ml. LPS führt über den *toll-like receptor 4* zur Aktivierung von NF- κ B und dadurch zur Induktion einer proinflammatorischen Kaskade. Anschließend wurde das Nitritlevel als Maß der NO-Produktion mithilfe des Griess-Tests gemessen und der MTT-Test als Maß der Zellviabilität durchgeführt.

Beim Griess-Test handelt es sich um eine 1879 von Peter Griess beschriebene Methode zum Nachweis von Nitrit,¹⁷⁶ die hier in einer Adaptation von Pollock et al.¹⁷⁷ verwendet wurde. Mithilfe eines Mikrotiterplatten-Spektrophotometers (Thermo Labsystems) wurde die Stärke eines Farbumschlags bei 550 nm in Abhängigkeit von der Nitritkonzentration gemessen und mit einer Standardkurve kalibriert, um absolute Werte zu erhalten.

Beim MTT-Test macht man sich die Fähigkeit lebender Zellen zunutze, Tetrazolium in Formazan umzuwandeln, das bei einer Wellenlänge von 570 nm mithilfe eines Spektrophotometers für Mikrotiterplatten (Thermo Labsystems) gemessen werden kann.¹⁷⁸ Der genaue Mechanismus dieser Reduktionsreaktion ist bis heute noch nicht im Detail verstanden, wahrscheinlich aber mit der Aktivität der Mitochondrien und einer Reduktion von MTT durch Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) verbunden. Durch den wahrscheinlich proportionalen Zusammenhang zwischen der Menge an produziertem Formazan und der Anzahl lebender Zellen kann dieser Test genutzt werden, um die Menge lebender Zellen abzuschätzen. Dazu wurden die Zellen für 45 min im Brutschrank mit MTT inkubiert und nach der Zugabe von *sodium dodecyl sulfate* (SDS) und Salzsäure (HCl) für weitere 24 h im Brutschrank belassen. Darauf folgte die Auswertung mithilfe des Spektrophotometers.

2.2.2.3 Untersuchung der TNF α -induzierten ICAM-1-Expression auf bEnd.3 Zellen

Um die Wirkung der PPAR δ -Aktivierung auf die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen zu untersuchen, wurden immortalisierte zerebrale Mausendothelzellen (bEnd.3 Zellen, ATCC) mit TNF α stimuliert und die ICAM-1-Expression mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. Mit der Durchflusszytometrie ist es möglich mittels fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern intra- oder extrazellulär exprimierte Antigene, wie in diesem Fall ICAM-1, nachzuweisen und über die Intensität des emittierten Lichts so indirekt auch ein Maß für die Höhe der Expression zu gewinnen. Dazu werden die in FACS Puffer gelösten Zellen vereinzelt an Lasern unterschiedlicher Wellenlänge vorbeigeleitet und das emittierte Licht der dadurch angeregten Fluoreszenzfarbstoffe mittels verschiedener Photozellen detektiert. Zusätzlich können über *forward scatter* (FSC) und *sideward scatter* (SSC) auch morphologische Charakteristika der Zelle, wie Größe und Granularität, bestimmt werden.

Bei den verwendeten zerebralen Mausendothelzellen handelt es sich um eine bei der *American Type Culture Collection* kommerziell erhältliche Endothelzelllinie, die mithilfe des NTKmT Retrovirus erzeugt wurde.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ Die Zellen wurden gemäß Herstellerangaben über maximal 16 Passagen kultiviert. Für den Versuch wurden die Zellen in Mikrotiterplatten mit sechs Kavitäten zu 500000 Zellen pro Kavität ausgesät und für 24 h im Inkubator belassen. Die darauf folgende Stimulation mit 10 ng/ml TNF α und die Behandlung mit SAR145 erfolgten zum selben Zeitpunkt. Die Zellen wurden mit SAR145 in den Konzentrationen 1 μ M, 25 μ M und 100 μ M gelöst in DMSO oder DMSO in der höchsten zur Lösung von SAR145 verwendeten Konzentration behandelt. Daraus ergaben sich acht verschiedene Gruppen aus stimulierten und nicht stimulierten Zellen, jeweils mit den genannten Behandlungen. Die Gruppen mit Stimulation wurden in je zwei Kavitäten durchgeführt, sodass insgesamt zwei Sechswellplatten pro Versuch benutzt wurden. Nach 18 h wurden die Zellen geerntet, in Zentrifugenröhrchen transferiert, gezählt, für 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in eiskaltem bovines Serum Albumin (BSA) und PBS zu 1 * 10⁶ Zellen/ml resuspendiert. Von diesen Zellsuspensionen wurden je 100 μ l auf jeweils zwei FACS Röhrchen verteilt und entweder mit dem ICAM-1 Primärantikörper (Abcam) für 30 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert oder als nicht gefärbte Kontrolle bis zur Analyse bei 4 °C aufbewahrt. Der Primärantikörper wurde 1:250 in BSA/PBS verdünnt eingesetzt. Daraufhin wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit eiskaltem PBS resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde drei Mal wiederholt, die Zellen nach der letzten Zentrifugation in BSA/PBS resuspendiert und für weitere 30 min bei 4 °C in Dunkelheit mit dem

Sekundärantikörper (Invitrogen) inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Zellen wurden erneut dreimal gewaschen in 300 µl FACS Flow (Becton Dickinson) resuspendiert und direkt analysiert. Die Daten der Durchflusszytometrie wurden mithilfe der FACSDiva Software (Becton Dickinson) an dem FACSCanto (Becton Dickinson) gewonnen und mit FlowJo (Flowjo) analysiert. Um tote Zellen aus den Analysen ausschließen zu können, wurden die Proben direkt vor der Analyse mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich Corp.) in einer Verdünnung von 1:100 versetzt, das die Zellkerne von permeabilisierten Zellen anfärbt. Zur Kalibrierung des Durchflusszytometers und zur Durchführung der Autokompensation wurde von jeder Gruppe sowohl eine ICAM-1 und DAPI gefärbte, eine ausschließlich DAPI gefärbte Gruppe, als auch eine ausschließlich ICAM-1 gefärbte Kontrolle bei 488 nm (488/30) und 450 nm (450/50) Wellenlänge gemessen. Es wurde die in Abb. 2.5 (S. 44) dargestellte *gating*-Strategie verwendet.

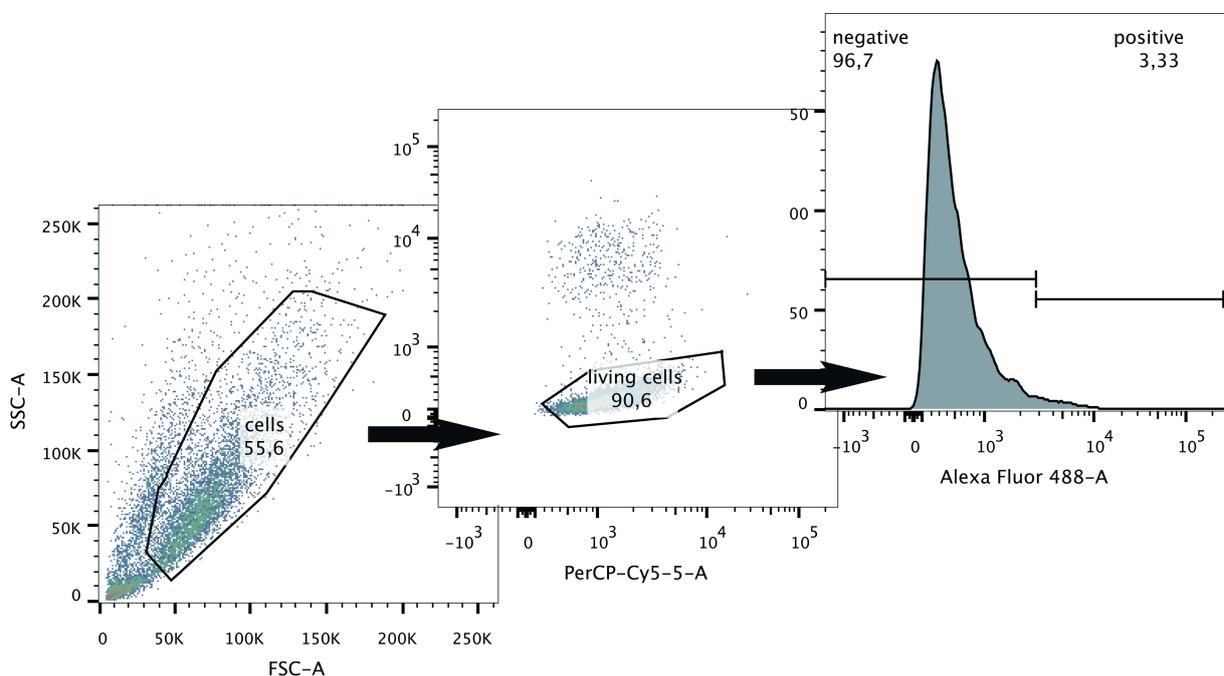


Abb. 2.5: Repräsentative *gating*-Strategie zur Analyse der bEnd.3 Zellen

Zunächst wurden über die Lage im FSC/SSC die Endothelzellen definiert (*cells*). Im zweiten Schritt wurden an der nicht stimulierten DMSO Kontrollgruppe über die Intensität bei 450 nm die lebenden, DAPI negativen Zellen (*living cells*) definiert. Im Histogramm der Alexa Fluor 488 Intensität wurde daraufhin an nicht stimulierten mit DMSO behandelten Zellen ein Intensitätsgrenzwert für eine als positiv gewertete ICAM-1-Expression festgelegt.

Mit diesen Voreinstellungen wurden je 5000 Zellen jeder Probe gemessen. Mit FlowJo (Flowjo) wurden die Daten weiter analysiert. Es wurde die ICAM-1-Expression bei stimulierten mit der bei nicht stimulierten Proben für jede Behandlung verglichen. Dazu wurde der Anteil der Zellen

gemessen, die eine ICAM-1-Expression zeigten, die oberhalb der bei nicht-stimulierten Kontrollzellen lag.

2.3 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde SPSS 22.0 (IBM), für die Auswertung der Daten aus den Verhaltensexperimenten wurde zusätzlich die Anwendung Graphpad-Prism 5.0 (Graphpad Software) verwendet. Für den Vergleich zweier unterschiedlicher Gruppen wurde der Student's t-Test für unverbundene Stichproben genutzt. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorielle *Analysis of Variance* (ANOVA) gefolgt von Tukey Post-hoc-Test oder (bei Messwiederholungen) eine zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen bzw. eine Analyse mithilfe eines gemischten linearen Modells jeweils mit Bonferroni-Test für Mehrfachvergleiche durchgeführt. Die Auswahl der Methoden folgte den Empfehlungen von Schlattmann und Dirnagl.¹⁸² Aufgrund geltender Konventionen und um die Vergleichbarkeit mit Vorarbeiten zu erhöhen, galten Messwerte mit $p < .05$ als *statistisch signifikant*. Für alle Ergebnisse, die statistisch untersucht wurden, sind jeweils der verwendete Test, sowie das Signifikanzniveau angegeben. Mittelwerte sind stets mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben.

3. Ergebnisteil

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Tiere gibt Tab. 3.1. Einzelheiten sind im Text an angegebener Stelle zu finden.

Tab. 3.1: Übersicht über alle verwendeten Tiere

Experiment (Absatznummer)	Eingeschlossen	Gesamt	Gestorben	Ausgeschlossen	Mittlere Infarkgröße
LDF (3.1)	6	6	0	0	-
Konz. SARI45 (3.2)	3	3	0	0	-
Dosis (3.3.1) nach drei Tagen					
Vehikel	45	51	3	3	44 %
1 mg/kg KG	13	16	2	1	41 %
10 mg/kg KG	13	15	0	2	35 %
30 mg/kg KG	13	13	0	0	35 %
100 mg/kg KG	14	15	1	0	41 %
Zeitpunkt (3.3.2) nach drei Tagen					
Vehikel	21	24	2	1	46 %
0 h	8	8	0	0	43 %
3 h	12	12	0	0	37 %
6 h	12	12	0	0	48 %
12 h	11	11	0	0	55 %
24 h	10	10	0	0	54 %
Knock-out (3.4) nach drei Tagen					
KO Vehikel	15	20	5	0	50 %
KO 10 mg/kg KG	13	20	4	3	56 %
WT Vehikel	8	10	1	1	49 %
WT 10 mg/kg KG	8	10	1	1	35 %
Verhalten (3.5.5) nach 28 Tagen					
Vehikel	6	10	4	0	28 %
10 mg/kg KG	9	10	1	0	37 %
Gesamt	240	276	24	12	

3.1 Laser-Doppler-Flussmessung bei MCAo

Um nachzuweisen, dass mithilfe des MCAo-Fadenmodells durch den Operateur zuverlässig eine Reduktion des zerebralen Blutflusses von > 85 % erreicht werden konnte, wurde an einer Stichprobe von n = 6 Tieren eine MCAo mit kontinuierlicher Laser-Doppler-Flussmessung durchgeführt. Aufgrund eines Softwarefehlers sind die Daten für eines der Tiere nicht verfügbar. Es zeigte sich, dass in 100 % der analysierten Fälle eine Reduktion des Blutflusses von > 85 % erreicht wurde (n = 5; Mittelwert = 89,11; Standardabweichung (SD) = 2,40)

3.2 Konzentration von SAR145 in Hirngewebe nach oraler Gabe

Um die Frage zu beantworten, ob SAR145 die intakte Bluthirnschranke überwinden kann, sollte die Konzentration des Liganden im Hirngewebe untersucht werden. Die in unserem Auftrag von der Firma Lipidomix (Berlin, Deutschland) durchgeführte massenspektroskopische Analyse des Hirngewebes nach oraler Gabe von SAR145 ergab eine Konzentration von $2,32 \pm 0,57 \mu\text{g/g}$ Hirngewebe. Insgesamt stimmt dies weitgehend mit den von Sanofi mitgeteilten Werten von einer maximalen Konzentration von $4,17 \mu\text{g/g}$ überein, da die Hirne 24 h nach der letzten Gabe des Liganden entnommen wurden und SAR145 im Hirngewebe eine Halbwertszeit von 23 h aufweist (*Sanofi unveröffentlichte Daten*). Es ist somit davon auszugehen, dass eine orale Gabe nach 2.2.1.3 zu einer zufriedenstellenden Verfügbarkeit des Liganden im Zielgewebe führt.

3.3 Charakterisierung des neuroprotektiven Effekts von SAR145 bei Wildtyp-Tieren

3.3.1 Dosisabhängige Wirkung von SAR145

Da SAR145 bisher noch nie im Schlaganfallmodell getestet wurde, musste zunächst die optimale Dosierung der Substanz gefunden werden. Dazu wurden die Tiere zum Zeitpunkt der Reperfusion entweder mit dem Liganden (in den Dosierungen 1 mg, 10 mg, 30 mg oder 100 mg/kg KG) oder Vehikel behandelt.

Bei der Untersuchung der Dosisabhängigkeit der Wirkung des PPAR δ -Liganden zeigte die Vehikelgruppe eine mittlere Infarktgröße von $44 \pm 15 \%$ (n = 45) der kontralateralen Hemisphäre. Diese reduzierte sich auf $35 \pm 13 \%$ (n = 13) bei mit 10 mg/kg KG und auf $35 \pm 15 \%$ (n = 13) bei mit 30 mg/kg KG behandelten Tieren der Verumgruppe. Dies entspricht einer relativen prozentualen Reduktion der Infarktgröße von 19 % im Vergleich zur Vehikelgruppe. Bei mit 1 mg/kg KG und mit 100 mg/kg KG behandelten Tieren der Verumgruppe lagen die mittleren Infarktgrößen bei $41 \pm 15 \%$ (n = 13) bzw. bei $41 \pm 13 \%$ (n = 14).

Ergebnisteil

Aus der Vehikelgruppe wurden drei Tiere ausgeschlossen, da sie nach histologischer Färbung der Hirnschnitte keinen Infarkt aufwiesen. Aus demselben Grund wurden aus der 1 mg/kg KG Gruppe ein Tier und aus der 10 mg/kg KG Gruppe zwei Tiere von der Analyse ausgeschlossen. Weitere drei Tiere der Vehikelgruppe, zwei Tiere der 1 mg/kg KG Gruppe und ein Tier der 100 mg/kg KG Gruppe verstarben, ohne dass die Gehirne asserviert werden konnten.

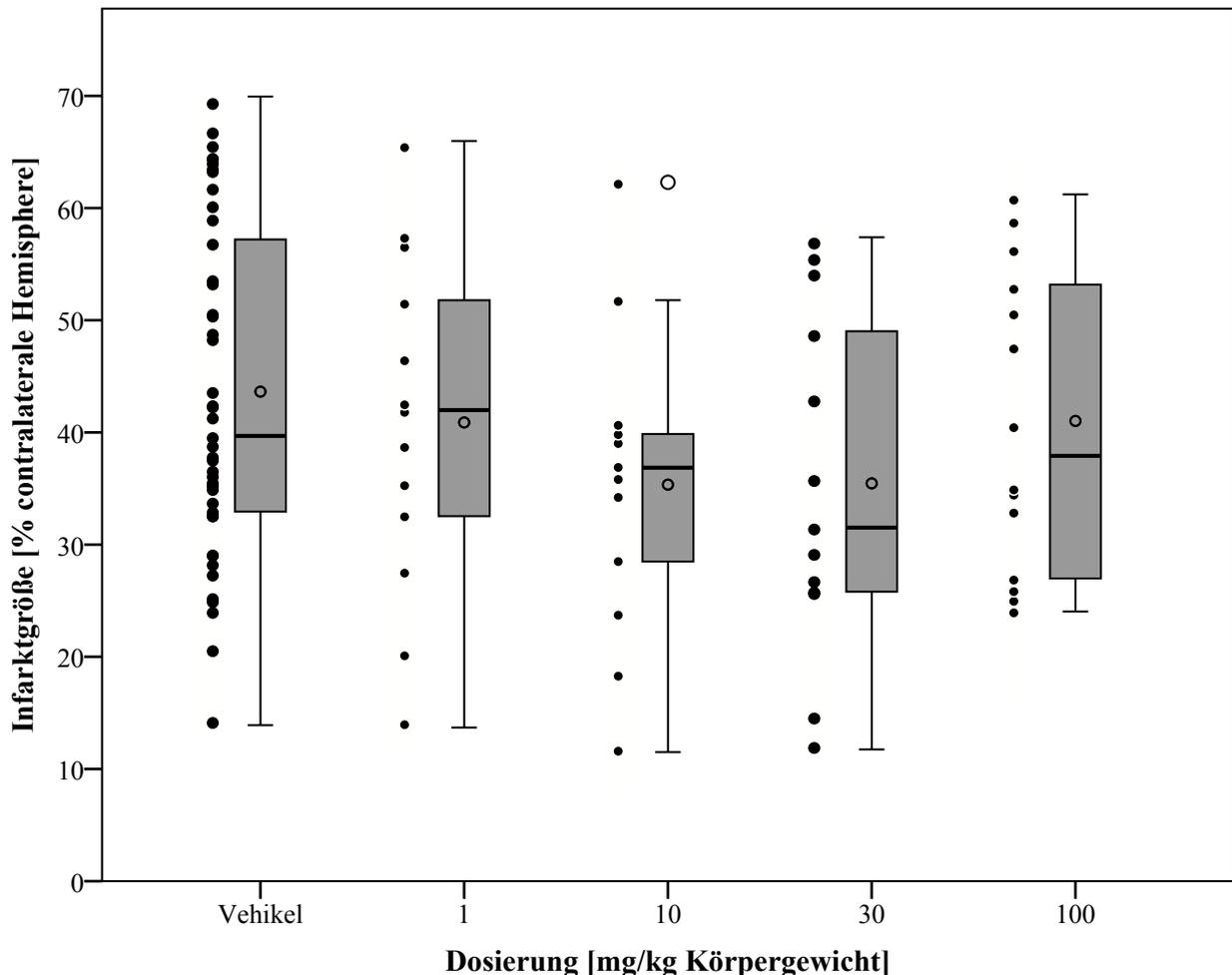


Abb. 3.1: Infarktgröße in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis von SAR145

Behandlung mit SAR145 in einer Dosierung von 10 mg/kg KG ($n = 13$) und 30 mg/kg KG ($n = 13$) reduzierte den Mittelwert der Infarkt volumina um 19 % im Vergleich mit Vehikel behandelten Tieren ($n = 45$). Bei 1 mg/kg KG ($n = 13$) und 100 mg/kg KG ($n = 14$) zeigte sich kein Effekt. Sämtliche Effekte waren in der ANOVA nicht signifikant ($p = .271$). Boxplot mit 25.- und 75.-Perzentile, Median (horizontale Linie in Box) und Mittelwert (Kreis in Box), sowie Whisker nach Tukey. Dotplot mit Darstellung aller in die Analyse eingegangenen Werte.

Mit eingeschlossen ist eine Kohorte von 30 Tieren verteilt auf die Gruppen 1 mg/kg KG (zwei Tiere), 100 mg/kg KG (13 Tiere) und Vehikel (15 Tiere), die abweichend von 2.2.1.5 ohne Verwendung des stereotaktischen Rahmens, ansonsten jedoch identisch operiert wurden. Es zeigte sich, dass bei Operation ohne den Rahmen die Tiere kleinere Infarkte aufwiesen. Der

Mittelwert der Infarkt volumina der auf diese Weise operierten Tiere der Vehikelgruppe lag bei $37 \pm 14 \%$ ($n = 13$; 1 gestorben, 1 ohne Infarkt) und war im Vergleich zu den Infarkt volumina der mit stereotaktischen Rahmen operierten Tieren der Vehikelgruppe ($46 \pm 14 \%$, $n = 32$) kleiner (zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben $p = .072$). Da jedoch bis auf zwei Tiere fast die gesamte 100 mg/kg KG Gruppe ohne stereotaktischen Rahmen operiert wurde und somit bei Herausnahme der ohne Rahmen operierten Tiere diese Gruppe wegfallen würde, werden die Daten trotz der beschriebenen Problematik gemeinsam dargestellt.

Insgesamt ergab die statistische Analyse dieser Daten in der ANOVA kein signifikantes Ergebnis, $F(4, 93) = 1,312$, $p = .271$. Die einzelnen Gruppen im Vergleich zeigt Abb. 3.1 (S. 48). Als optimale Dosierung X für alle weiteren Versuche wurde 10 mg/kg KG festgelegt. Formal statistisch muss Hypothese H_{11} (S. 19) jedoch abgelehnt werden.

3.3.2 Abhängigkeit der Wirkung von SAR145 vom Zeitpunkt der ersten Gabe

Im klinischen Alltag ist die Gabe eines Neuroprotektivums zum Zeitpunkt des Schlaganfalls in der Regel nicht möglich. Für eine potentielle Translation der Ergebnisse ist deshalb die Abhängigkeit der Wirkung vom Zeitpunkt der ersten Gabe von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grunde fordern die STAIR Richtlinien eine Testung der Substanz mit unterschiedlichen Latenzen nach dem Zeitpunkt der Reperfusion^{153,154} (therapeutisches Zeitfenster). Um dieses therapeutische Zeitfenster für SAR145 zu charakterisieren, wurde die Substanz in einer Dosierung von 10 mg/kg KG zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 12 und 24 h nach Reperfusion gegeben. Analog dazu wurde eine Vergleichsgruppe mit Vehikel behandelt. Sämtliche Gruppen wurden gemäß 2.2.1.5 operiert.

Für die Vehikelgruppe ergab sich ein zur Dosisfindungsstudie vergleichbares Ergebnis von einer mittleren Infarktgröße von $46 \pm 15 \%$ ($n = 21$). Die mittlere Infarktgröße verringerte sich bei Behandlung mit SAR145 drei Stunden nach Reperfusion auf $37 \pm 14 \%$ ($n = 12$). Die mittlere Infarktgröße bei Gabe zum Zeitpunkt der Reperfusion lag bei $43 \pm 18 \%$ ($n = 8$). Tiere, die 6, 12 und 24 h nach Reperfusion das erste Mal behandelt wurden, zeigten im Mittel größere Infarkte von $48 \pm 17 \%$ ($n = 12$), $55 \pm 16 \%$ ($n = 11$) bzw. $54 \pm 16 \%$ ($n = 10$). Insgesamt ergaben die Daten in der ANOVA kein statistisch signifikantes Ergebnis, $F(5, 68) = 2,049$, $p = .083$. Die Ergebnisse der Zeitfensterstudie zeigen eine mögliche Neuroprotektion bis zu drei Stunden nach Reperfusion bei einer Dosierung von 10 mg/kg KG. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung des funktionellen Ergebnisses in der Langzeitbeobachtung eine Dosierung X von

10 mg/kg KG mit einer Latenz T von drei Stunden gewählt. Hypothese H_{12} (S. 20) muss jedoch formal statistisch abgelehnt werden.

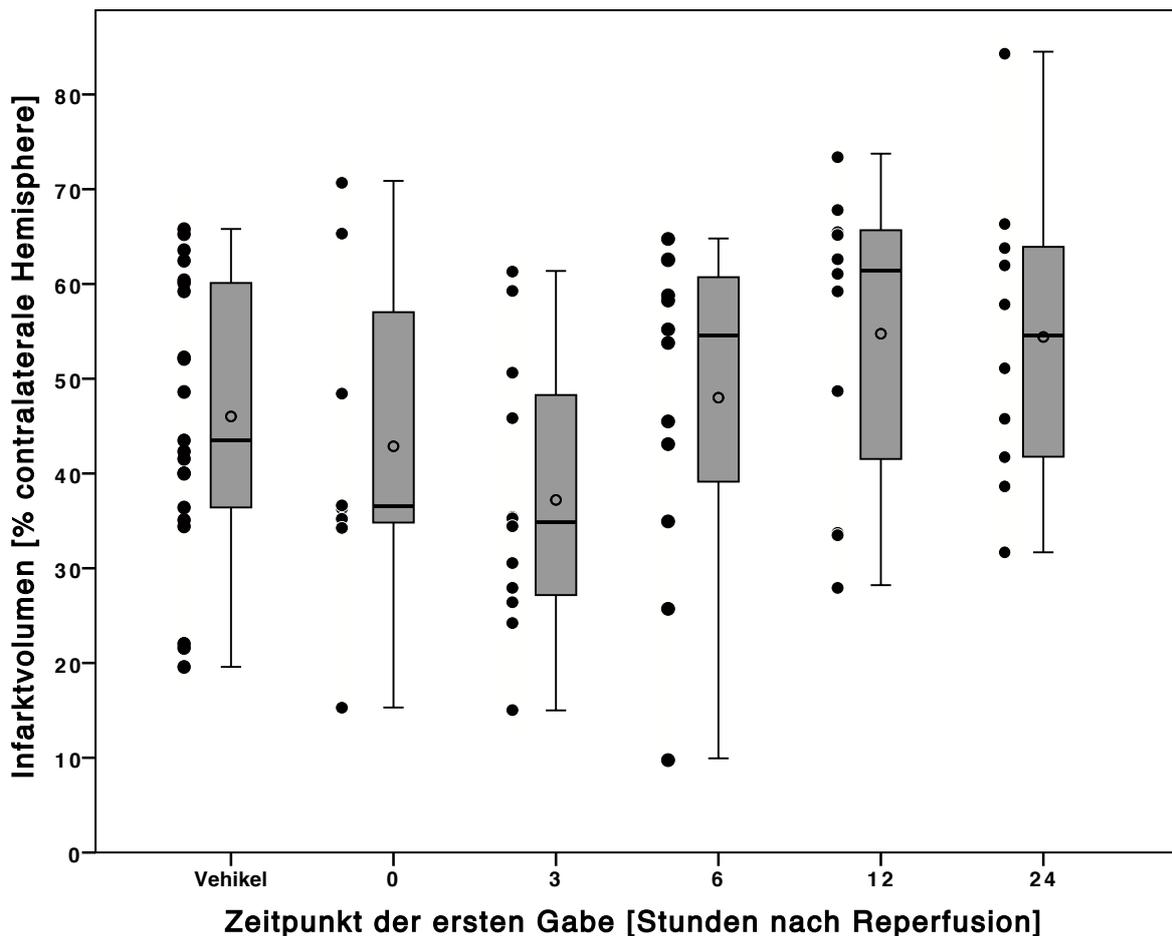


Abb. 3.2: Infarktgröße in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der ersten Gabe von SAR145

Behandlung mit SAR145 in einer Dosierung von 10 mg/kg KG oder Vehikel zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 12, und 24 h nach Reperfusion. Behandlung mit SAR145 zum Zeitpunkt der Reperfusion ($n = 8$) und bis 3 h ($n = 12$) nach Reperfusion reduzierte das mittlere Infarktvolumen um bis zu 19 % bei einer Behandlung nach 3 h im Vergleich zu Vehikelbehandlung ($n = 21$). Die mittleren Infarktvolumina bei einer Behandlung 6 h ($n = 12$), 12 h ($n = 11$) und 24 h ($n = 10$) nach Reperfusion lagen über dem der Vehikel behandelten Tieren. Boxplot mit 25.- und 75.- Perzentile, Median (horizontale Linie in Box) und Mittelwert (Kreis in Box), sowie Whisker nach Tukey. Parallel dazu Dotplot mit Darstellung aller in die Analyse eingegangenen Werte.

3.4 Untersuchung der PPAR δ -spezifischen neuroprotektiven Wirkung von SAR145 an PPAR δ -Knock-out-Tieren

Durch die Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung von SAR145 an Tieren, deren Zellen kein PPAR δ besitzen (PPAR δ -Knock-out-Tiere), sollte untersucht werden, ob der beobachtete Effekt abhängig von einer Aktivierung von PPAR δ durch SAR145 ist. Dazu wurden 40 PPAR δ -Knock-out und 20 Wildtyp-Tiere randomisiert jeweils zu gleichen Teilen in eine Vehikel- und

eine Verumgruppe aufgeteilt. Die Behandlung erfolgte zum Zeitpunkt der Reperfusion in einer Dosierung von 10 mg/kg KG für die Verumgruppe. Aus der Wildtyp-Verumgruppe musste ein Tier aufgrund morphologischer Auffälligkeiten aus dem Versuch ausgeschlossen werden. Ein Tier der Wildtyp-Vehikelgruppe starb aufgrund von Komplikationen bei der Narkoseeinleitung. Ein Tier der Knock-out-Verumgruppe starb direkt nach der Operation und wurde ebenfalls aus allen weiteren Analysen ausgeschlossen.

Aus der Analyse der Infarkt volumina mussten zudem jeweils ein Tier der Wildtyp-Vehikelgruppe und der Wildtyp-Verumgruppe, sowie fünf Tiere der Knock-out-Vehikelgruppe und vier Tiere der Knock-out-Verumgruppe ausgeschlossen werden, da sie zu einem nicht genau bestimmbar Zeitpunkt nach der Operation starben und somit die Gehirne nicht asserviert werden konnten.

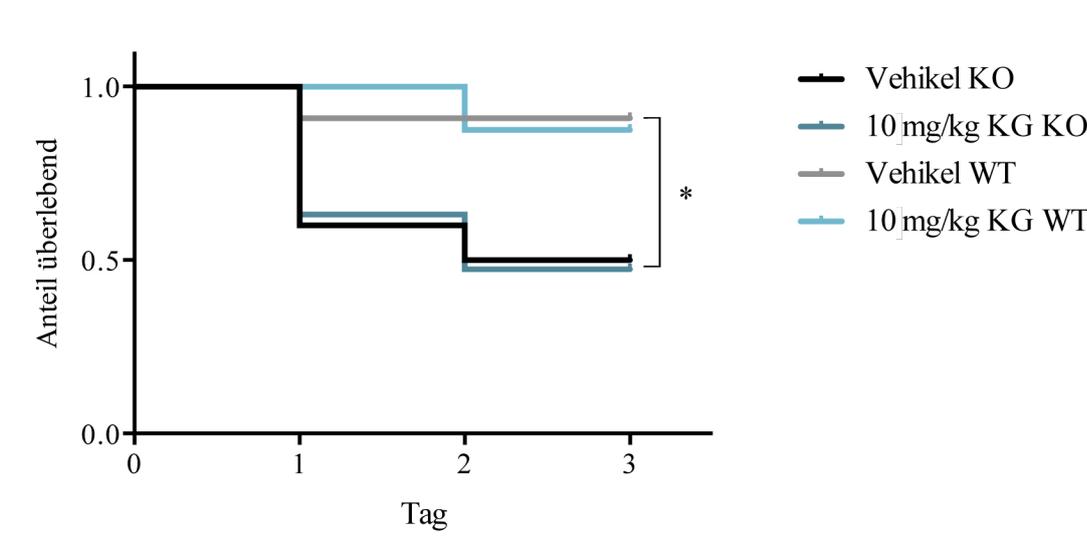


Abb. 3.3: Kaplan-Meier-Kurve des Anteils der überlebenden Knock-out- und Wildtyp-Tiere

PPAR δ -Knock-out-Tiere zeigen eine signifikant höhere Mortalität als Wildtyp-Tiere. In der Knock-out-Vehikelgruppe starben fünf Tiere, fünf wurden gemäß Abbruchkriterien vorzeitig getötet. In der Knock-out-Verumgruppe starben vier Tiere, sechs wurden gemäß den Abbruchkriterien vorzeitig getötet. In den Wildtypgruppen starb jeweils ein Tier. Der Unterschied in der Mortalität von Knock-out- zu Wildtyp-Tieren war signifikant unterschiedlich (Vehikel KO vs. Vehikel WT: Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test $\chi^2 = 4,608$, $p = .0318$; 10 mg/kg KG KO vs. 10 mg/kg KG WT: Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test $\chi^2 = 4,05$, $p = .0442$); * $p < .05$

Zwei weitere Tiere der Knock-out-Verumgruppe wiesen keine Infarkte auf. Die erhöhte Mortalität der Knock-out-Tiere (siehe Abb. 3.3, S. 51) ist für die Interpretation der erhobenen Infarktgrößen entscheidend. Tiere, die aufgrund von Abbruchkriterien vorzeitig getötet werden mussten, wiesen im Mittel größere Infarkte auf. In der Knock-out-Verumgruppe zeigten die gemäß Abbruchkriterien getöteten Tiere um durchschnittlich 36 % größere Infarkte als die nach 72 h getöteten Tiere. In der Knock-out-Vehikelgruppe waren die Infarkte der aufgrund von

Abbruchkriterien vorzeitig getöteten Tiere im Mittel 52 % größer als die der nach 72 h getöteten Tieren. (Knock-out-Tiere: vorzeitig verstorben (n = 11) vs. Tod nach 72 h (n = 17) jeweils in Vehikel- und Verumgruppe, einfaktorielle ANOVA mit Tukey Post-hoc-Test; $F(3, 24) = 7,669$, $p = .001$; Vehikel: $p = .004$; Verum: $p = .043$). Deshalb ist davon auszugehen, dass auch die vorzeitig verstorbenen Tiere, deren Hirne nicht asserviert werden konnten, größere Infarkte aufgewiesen hätten und dadurch die erhobenen Mittelwerte für die Knock-out-Vehikelgruppe ($50 \pm 16 \%$, $n = 15$) und die Knock-out-Verumgruppe ($56 \pm 12 \%$, $n = 13$) unterhalb der tatsächlichen Mittelwerte liegen.

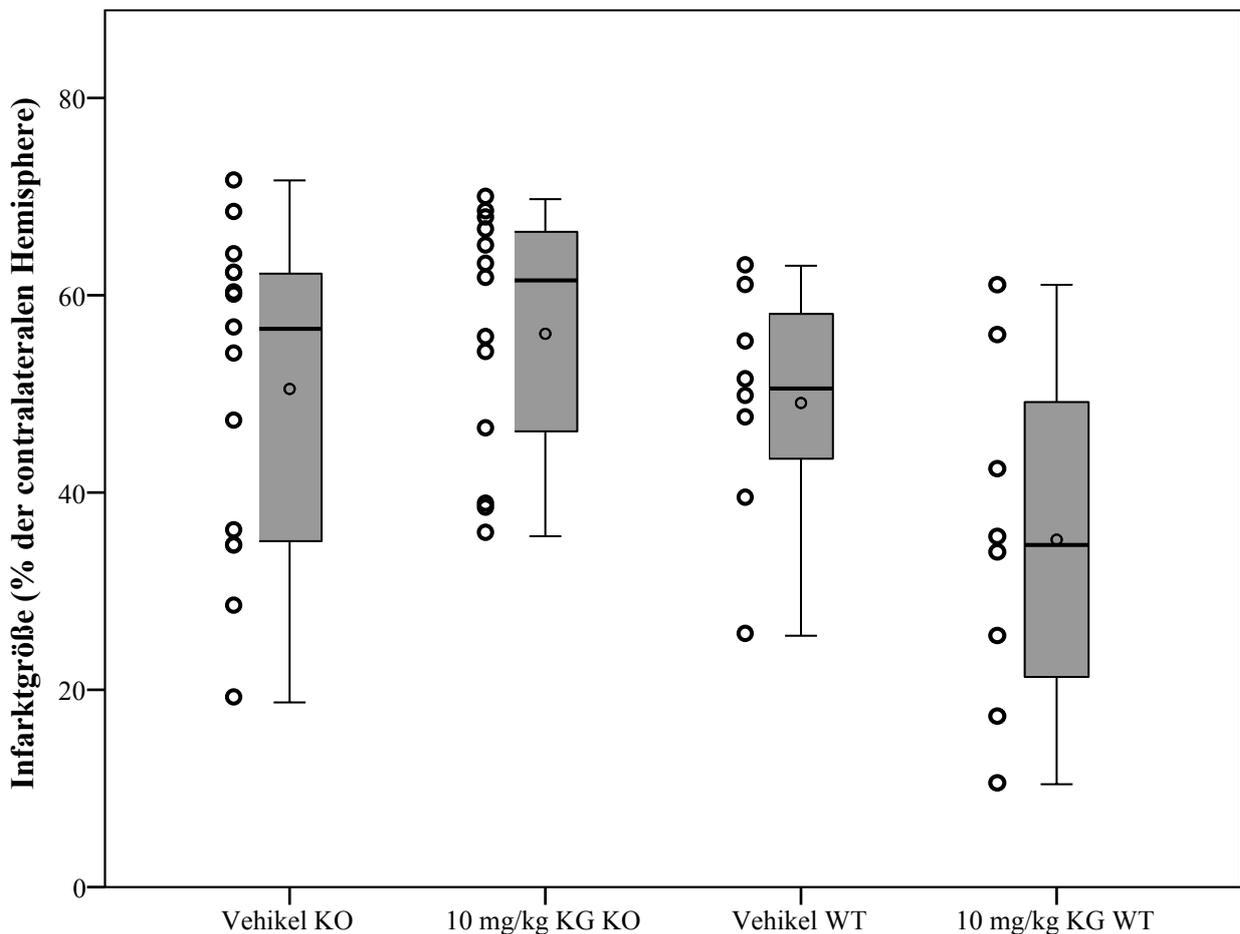


Abb. 3.4: Infarktgrößen der Vehikel- und Verumgruppen der Knock-out- und der Wildtyp-Tiere

Die Mittelwerte der Infarktgrößen in der Knock-out-Vehikelgruppe ($50 \pm 16 \%$, $n = 15$) und der Knock-out-Verumgruppe ($56 \pm 12 \%$, $n = 13$) unterschieden sich nicht signifikant (t-Test für unabhängige Stichproben $p = .324$). Auch die Mittelwerte der Wildtyp-Vehikelgruppe ($n = 8$) und der Wildtyp-Verumgruppe ($n = 8$) waren nicht signifikant unterschiedlich, zeigten jedoch den Ergebnissen der Dosisfindungs- und Zeitpunktstudie sehr ähnliche Werte (Reduktion der Infarktgröße von 28 %). Behandlung mit 10 mg/kg KG SAR145 oder Vehikel in allen Gruppen zum Zeitpunkt der Reperfusion. Boxplot mit 25.- und 75.-Perzentile, Median (horizontale Linie in Box) und Mittelwert (Kreis in Box), sowie Whisker nach Tukey. Dotplot mit Darstellung aller in die Analyse eingegangenen Werte.

Die Mittelwerte der Infarktgrößen der Wildtyp-Vehikelgruppe ($49 \pm 12 \%$, $n = 8$) und der Wildtyp-Verumgruppe ($35 \pm 18 \%$, $n = 8$) waren vergleichbar mit den Ergebnissen der Dosisfindungs- und Zeitpunktstudie (siehe 3.3.1, S. 47 bzw. 3.3.2, S. 49). Diese Ergebnisse sind gut vereinbar mit Vorarbeiten, die ebenfalls ein vergrößertes Infarktvolumen bei Knock-out-Tieren fanden.^{145,146}

Da eindeutig keine Reduktion der Infarktgröße in der Knock-out-Verumgruppe im Vergleich zur Knock-out-Vehikelgruppe besteht, wird Hypothese H₁₃ (S. 20) damit wie erwartet abgelehnt.

3.5 Charakterisierung des funktionellen und morphologischen Endergebnisses im subakuten Stadium nach fokaler zerebraler Ischämie

Um die neuroprotektive Potenz einer Substanz und die Effekte auf das funktionelle Endergebnis zu ermitteln und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf klinische Studien zu erhöhen, fordern die STAIR-Richtlinien eine Evaluation des funktionellen und morphologischen Ergebnisses sowohl in der akuten Phase (1-3 Tage nach MCAo) als auch über einen längeren Beobachtungszeitraum (7-30 Tage nach MCAo).¹⁵³

Jeweils 10 Tiere wurden drei Stunden nach Reperfusion entweder mit SAR145 in einer Dosierung von 10 mg/kg KG oder mit Vehikel behandelt. Alle 20 Tiere wurden am gleichen Tag von derselben Person operiert. Die Randomisierung und Verblindung erfolgte nach 2.2.1.1. Der Operateur/Untersucher war für die gesamte Zeit des Experiments für die Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Tiere verblindet.

Die beiden Gruppen zeigten eine vergleichbare Entwicklung des Körpergewichts mit einem typischen Gewichtsverlust¹⁵⁵ v. a. in der ersten Woche nach MCAo (siehe Abb. 3.5, S. 54.). Es zeigte sich jedoch eine erhöhte Mortalität in der mit Vehikel behandelten Gruppe (siehe Abb. 3.6, S. 54).

Ergebnisteil

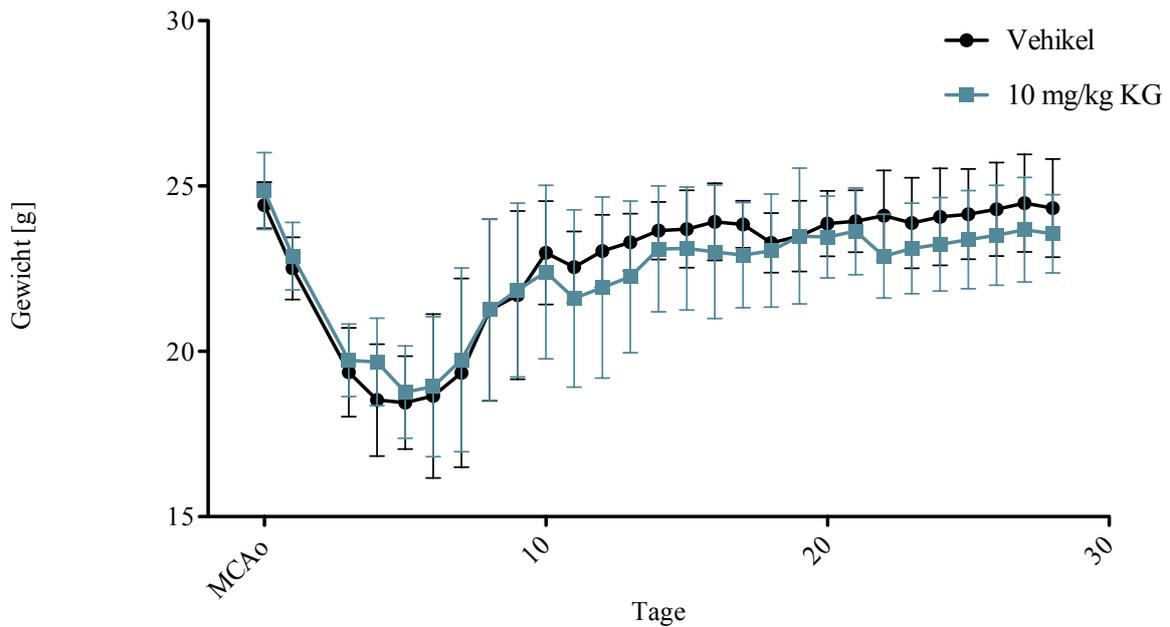


Abb. 3.5: Gewichtsverlauf der Vehikel- und der Verumgruppe über 28 Tage

Die Gewichtskurve der an den Verhaltensexperimenten beteiligten Tiere zeigte in beiden Gruppen eine deutliche Gewichtsabnahme in der ersten Woche. Der Nadir lag in beiden Gruppen nach 6 Tagen mit einer langsamen Erholung des Gewichts und einem Erreichen des Ausgangsgewichts nach 28 Tagen. Angegeben sind Mittelwerte \pm 2 Standardabweichungen.

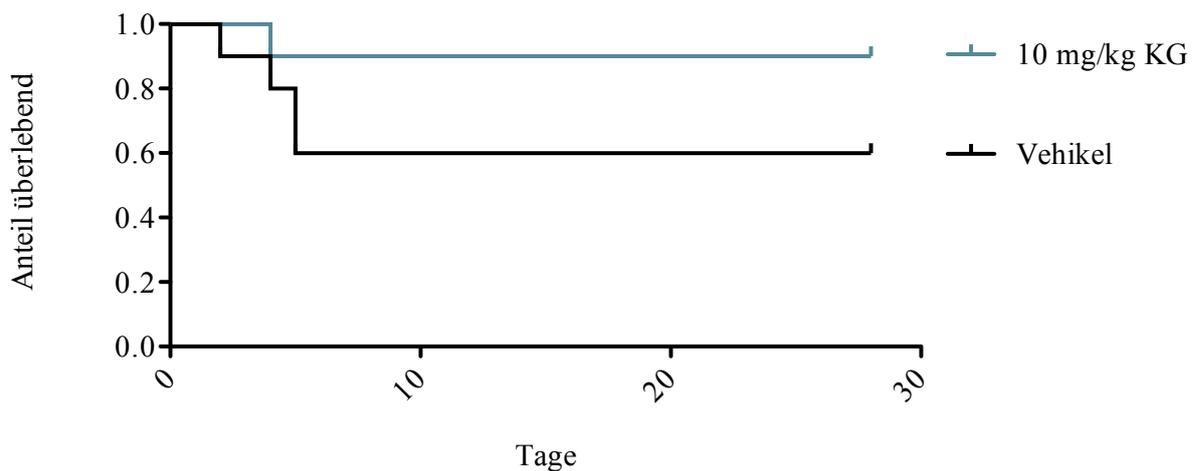


Abb. 3.6: Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenswahrscheinlichkeit in der Langzeitbeobachtung

In der Gruppe der mit SAR145 behandelten Tiere ($n=10$) starb am ersten Tag nach MCAo ein Tier, während in der mit Vehikel behandelten Gruppe ($n=10$) jeweils am 3. und am 4. Tag nach MCAo zwei Tiere starben. Dieser Unterschied war jedoch in statistischen Auswertung (Gehan-Breslow-Wilcoxon) nicht signifikant ($p=.14$).

3.5.1 RotaRod

Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen Vehikelgruppe und Verumgruppe. Tiere der Verumgruppe blieben zu allen untersuchten Zeitpunkten im Vergleich zur Untersuchung vor MCAo signifikant kürzer auf dem RotaRod (zweifaktorielle ANOVA mit wiederholten Messungen und Mehrfachvergleichen mit dem Bonferroni-Test; Effekt der Behandlungsgruppe: $F(1, 13) = 2,4$, $p = .14$; Effekt des Zeitpunkts: $F(4, 13) = 14,9$, $p = <.0001$; Gruppe x Zeit Interaktion: $F(4, 13) = 0,55$, $p = .69$)

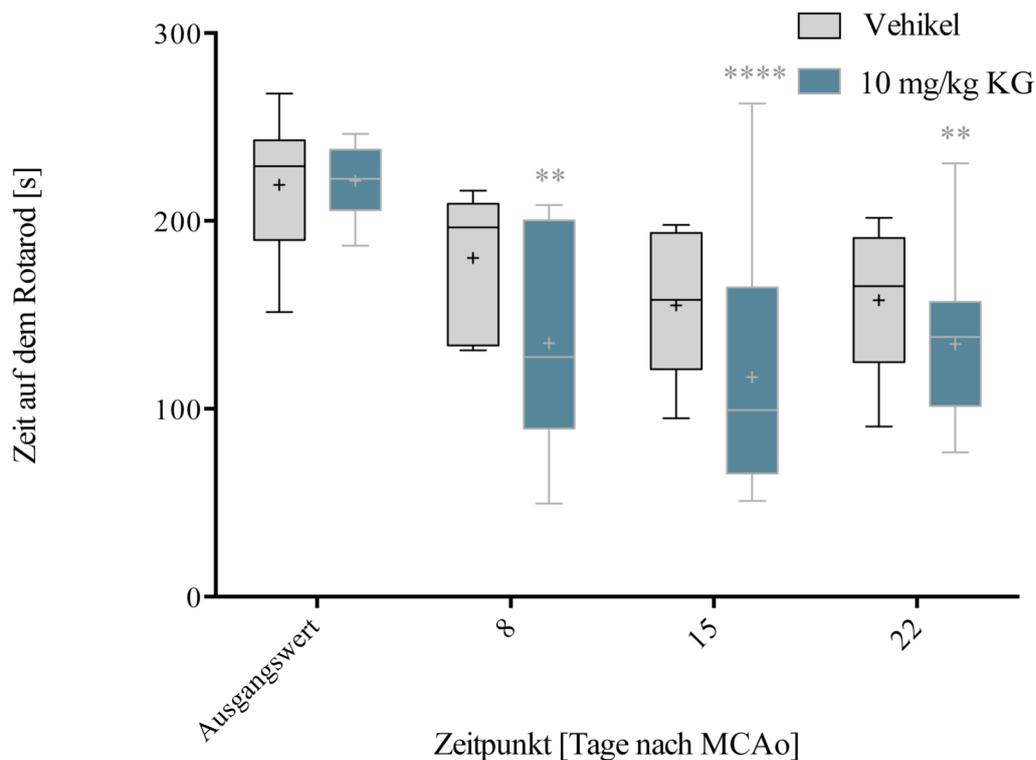


Abb. 3.7: Ergebnisse RotaRod der Vehikel- und Verumgruppe

Boxplot mit 25.- und 75.- Perzentile, Median (horizontale Linie in Box) und Mittelwert (Plus in Box), sowie Whisker nach Tukey. Zweifaktorielle ANOVA mit Mehrfachvergleich mittels Bonferroni-Test. Die Gruppenwerte zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach MCAo jeweils mit dem Gruppenwert vor MCAo verglichen (Vehikel $n = 6$; 10 mg/kg KG $n = 9$); **** $p < .0001$; *** $p < .001$; ** $p < .01$.

3.5.2 Corner Test

Beide Gruppen zeigten nach MCAo bei der Umkehrbewegung eine Präferenz zur ipsilateralen Seite. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Vehikel-Gruppe und der Verum-Gruppe (zweifaktorielle ANOVA mit wiederholten Messungen und Mehrfachvergleichen mit dem Bonferroni-Test; Effekt der Behandlungsgruppe:

Ergebnisteil

$F(1, 13) = 2,1, p = .17$; Effekt des Zeitpunkts: $F(2, 13) = 2,5, p = .09$; Gruppe x Zeit Interaktion: $F(2, 13) = 0,39, p = .67$). Beim ersten Untersuchungszeitpunkt am Tag 1 nach MCAo konnte der Test aufgrund der schweren Beeinträchtigung der Tiere nicht durchgeführt werden. Es liegen keine Daten zu den Gruppen bezüglich der Seitenpräferenz vor MCAo vor. Es wird jedoch angenommen, dass naive Tiere keine Seitenpräferenz zeigen.¹⁷²

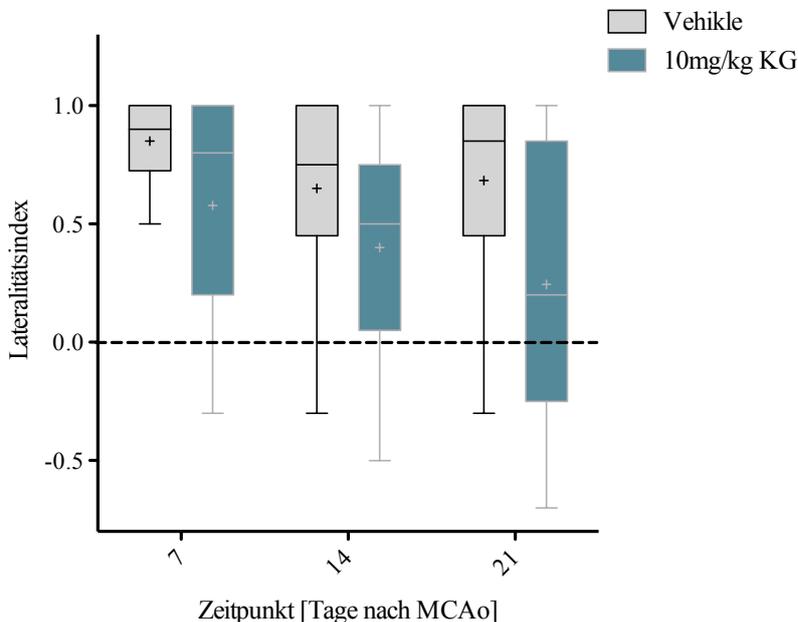


Abb. 3.8: Ergebnisse Corner Test der Vehikel- und Verumgruppe

Boxplot mit 25.- und 75.-Perzentile, Median (horizontale Linie in Box) und Mittelwert (Plus in Box), sowie Whisker nach Tukey. Dargestellt ist der Lateralitätsindex nach Gleichung 1 (S. 36). Positive Werte entsprechen einer präferenziellen Umkehrbewegung zur ipsilateralen Seite. Vehikel $n = 6$; 10 mg/kg KG $n = 9$.

3.5.3 Pole Test

Bei der Untersuchung der Bewegungseinschränkung mithilfe des Pole Tests ergab sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Da dieser Test besonders stark von der Motivation und dem individuellen Zustand der Tiere abhängig ist, konnten nicht zu jedem Zeitpunkt von allen Tieren valide Daten erhoben werden. Um dennoch eine sinnvolle statistische Auswertung zu ermöglichen, wurde das lineare gemischte Modell zur Analyse der Daten verwendet. Dieses kann im Gegensatz zur zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung mit dem Fehlen von Daten an einzelnen Messzeitpunkten umgehen, ohne alle Daten des jeweiligen Tieres auszuschließen. Da die Abhängigkeit der Daten voneinander nicht bekannt ist, wurde ein unstrukturierter Kovarianztyp bei Messwiederholung angenommen. Dadurch ist die Anzahl der Tiere pro Gruppe, die in die

Ergebnisteil

Analyse mit eingeflossen sind, nicht zu jedem Messzeitpunkt identisch. Es ergab sich in beiden Gruppen eine signifikante Einschränkung der Umkehrbewegung und des Herabkletterns im Vergleich zu den Ausgangswerten vor MCAo (Lineares Gemischtes Modell; TT: Effekt der Behandlungsgruppe: $F(1, 14) = 0,379$, $p = .55$; Effekt des Zeitpunkts: $F(3, 18) = 8,95$, $p = .001$; Gruppe x Zeit Interaktion: $F(3, 18) = 2,26$, $p = .115$; TD: Effekt der Behandlungsgruppe: $F(1, 19) = 0,9$, $p = .35$; Effekt des Zeitpunkts: $F(3, 20) = 7,84$, $p = .001$; Gruppe x Zeit Interaktion: $F(3, 20) = 0,722$, $p = .55$).

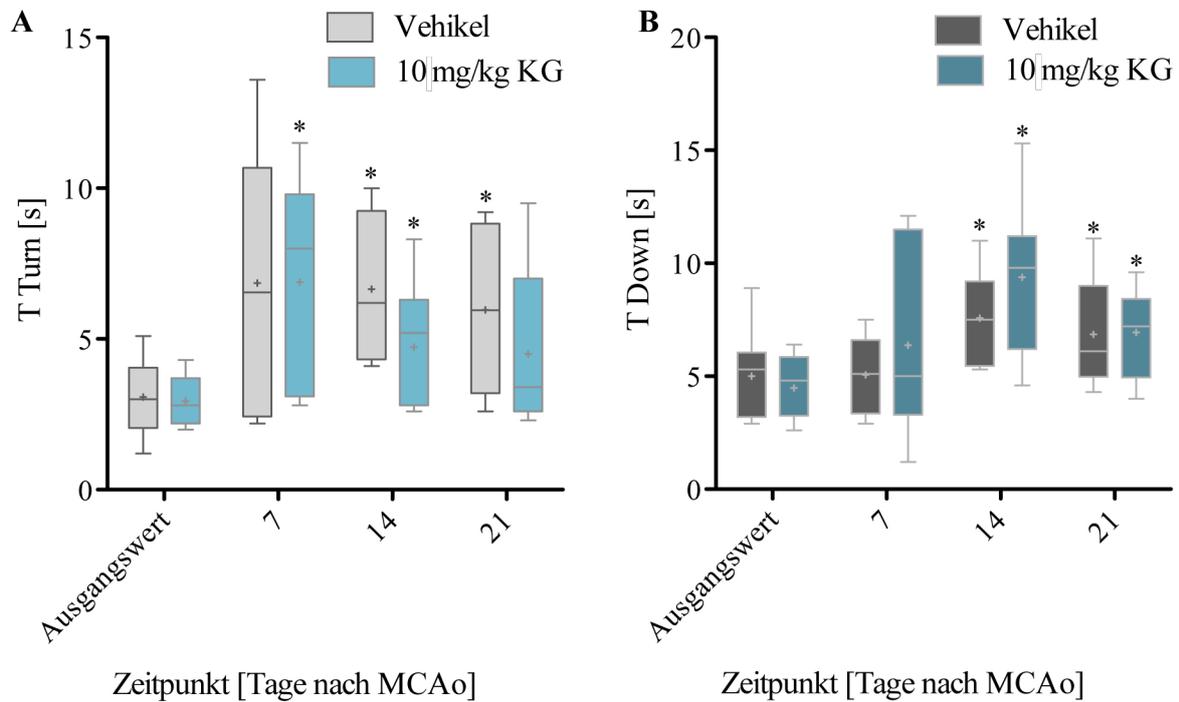


Abb. 3.9: Ergebnisse Pole Test der Vehikel- und Verumgruppe

Boxplot mit 25.- und 75.-Perzentile, Median (horizontale Linie in Box) und Mittelwert (Plus in Box), sowie Whisker nach Tukey. Lineares gemischtes Modell mit Bonferroni-Test. Die Gruppenwerte zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach MCAo jeweils mit dem Gruppenwert vor MCAo (Ausgangswert) verglichen. (A) Zeit bis zur vollständigen Umwendung, Vehikel $n = 6-10$; 10 mg/kg KG $n = 7-10$. (B) Zeit bis zum Erreichen des Bodens, Vehikel $n = 6-10$; 10 mg/kg KG $n = 7-10$. * $p < .05$

3.5.4 CatWalk

Aufgrund der relativ starken körperlichen Beeinträchtigung der Tiere in den ersten Tagen konnte die Testung am dritten Tag nach MCAo nicht wie geplant durchgeführt werden. Zur Analyse der Daten wurde ein lineares gemischtes Modell mit Messwiederholung und dem zusätzlichen Innersubjektfaktor „Seite“ (linke vs. rechte Seite), sowie dem Zwischensubjektfaktor „Gruppe“ (Vehikel vs. 10 mg/kg KG) gewählt. Da keine *scheinoperierten* Kontrollgruppen mituntersucht wurden, wurde der Ausgangswert vor MCAo als Kontrolle zum Nachweis MCAo-spezifischer

Effekte genutzt. Auf der zum Schlaganfall contralateralen Seite waren im Vergleich zur ipsilateralen Seite in beiden Gruppen die maximale Kontaktfläche der Hinterläufe sowie der prozentuale Anteil der Standphase an einem gesamten Schrittzzyklus postoperativ stärker verändert.

Ohne Asymmetrie war zudem die Geschwindigkeit der Schwungphase der Hinterläufe in beiden Gruppen nach MCAo verlangsamt. Die Dauer der Standphase, die Pfotenkoordination und die Zeit während eines Gangzyklus, in der das Tier nur eine einzelne Pfote belastet, waren lediglich in der Verumgruppe zu den Zeitpunkten nach MCAo verändert (siehe Tab. 3.2, S. 59), wobei sich diese Effekte mit der Zeit verstärkten. Dies ist jedoch wahrscheinlich nicht auf eine zerebrale Wirkung von SAR145, sondern vielmehr auf eine systemische Nebenwirkung zurückzuführen. Die Tiere zeigten nach vierwöchiger Behandlung an allen Pfoten hyperkeratotische Schwielen (Einzelheiten siehe 4.1.4, S. 72). Trotz vergleichbarem Gewichtsverlauf waren dadurch die Fußabdrücke der behandelten Tiere mit dem verwendeten CatWalk-System nur noch unzureichend zu detektieren (siehe Abb. 3.10, S. 58), sodass eine zuverlässige Auswertung der Gangparameter teilweise nicht mehr möglich war.

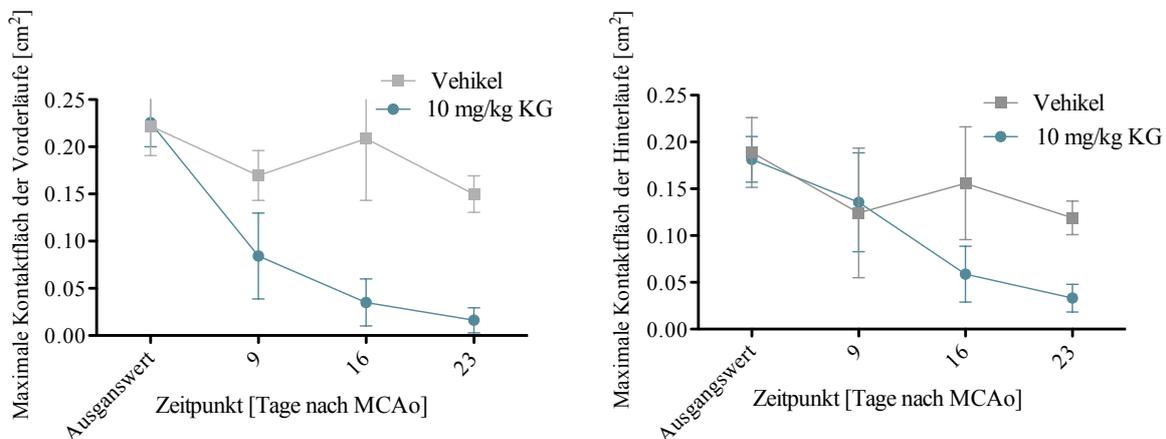


Abb. 3.10: Verlauf der maximalen Kontaktfläche der Vorder- und Hinterläufe über die Zeit

Die detektierbare maximale Kontaktfläche der Vorder- und Hinterläufe unterschied sich ausgehend von einer nahezu identischen Ausgangswerten zu späteren Zeitpunkten deutlich zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

Da keine der dargestellten Analysen eine funktionell Verbesserung durch eine Behandlung mit SAR145 belegt, wird Hypothese H₁₄ (S. 20) abgelehnt.

Tab. 3.2: Übersicht über die Ergebnisse der Analyse der im CatWalk erhobenen Parameter

Dargestellt sind die Ergebnisse eines linearen gemischten Modells mit Meßwiederholung und dem Innersubjektfaktor „Seite“ (links vs. rechts) und Zwischensubjektfaktor „Gruppe“ (Vehikel vs. 10 mg/kg KG) mit F Statistik (F) und Signifikanzniveau (Sig.). Nicht zu jedem Zeitpunkt konnten von allen Tieren ausreichend valide Durchläufe aufgezeichnet werden. n = 6-9 pro Gruppe. Fettgedruckt sind Werte mit $p < .05$.

Parameter	Gruppe				Zeit				Seite				Kommentar
	vor MCAo		9 Tage nach MCAo		Vehikel		10 mg/kg KG		Vehikel		10 mg/kg KG		
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	
Average Speed	2,027	.177	0,769	.398	3,866	.023	1,324	.293					Insgesamt ergab sich keine signifikante Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Behandlungsgruppe.
RF Max Contact Area (cm ²)	0,788	.381	14,600	.002	10,581	< .001	89,065	< .001	2,014	.163	0,089	.767	In beiden Gruppen war die maximale Kontaktfläche nach MCAo verringert, wobei der Effekt auf der contralateralen (rechten) Seite an den Hinterläufen deutlicher ausgeprägt war.
LF Max Contact Area (cm ²)	0,078	.783	16,431	.001	14,600	< .001	125,087	< .001	5,008	.030	1,736	.194	
RH Max Contact Area (cm ²)	0,024	.878	0,438	.516	5,168	.004	25,892	< .001					
LH Max Contact Area (cm ²)	0,207	.653	0,087	.771	12,587	< .001	58,193	< .001	3,700	.062	3,880	.056	Dieser Parameter gibt die Dauer der Standphasen an. Es zeigte sich in der mit SARI45 behandelten Gruppe eine scheinbare Verkürzung der Standphase. Dies ist jedoch wahrscheinlich nicht auf die MCAo zurückzuführen. In der Vehikelgruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied über die Zeit.
RF Stand (s)	0,455	.507	0,729	.414	0,749	.531	33,065	< .001	0,532	.472	0,006	.939	
LF Stand (s)	0,001	.977	0,328	.577	0,228	.876	23,015	< .001					
RH Stand (s)	1,918	.183	0,018	.894	1,411	.258	10,620	< .001	3,700	.062	3,880	.056	
LH Stand (s)	1,603	.214	0,004	.949	1,562	.219	14,313	< .001	0,008	.928	0,823	.369	Der Parameter Swingspeed gibt die Geschwindigkeit der Pfote während der Schwungphase an. Für beide Gruppen ergab sich eine verlangsamt Schwungphase der Hinterläufe nach MCAo, dabei zeigte sich jedoch keine Seitensymmetrie.
RF Swingspeed (mm/s)	0,112	.741	9,794	.009	3,374	.032	21,579	< .001	2,015	.165	2,610	.115	
LF Swingspeed (mms/s)	0,674	.421	4,627	.039	2,210	.107	24,318	< .001					
RH Swingspeed (mms/s)	0,707	.410	0,313	.578	2,067	.123	6,551	.001					
LH Swingspeed (mm/s)	0,635	.431	0,618	.008	3,023	.046	6,999	.001	0,637	.433	0,328	.570	Der DutyCycle beschreibt den prozentualen Anteil der Standphase an einem gesamten Schrittzyklus (Stand- & Schwungphase). Es zeigte sich in beiden Gruppen eine Verringerung der Standphase der contralateralen (rechten) Hinterpfote nach MCAo.
RF DutyCycle (%)	0,828	.381	7,539	.019	0,574	.642	40,445	< .001	5,658	.023	4,903	.034	
LF DutyCycle (%)	0,078	.783	6,420	.023	0,500	.686	30,747	< .001					
RH DutyCycle (%)	0,012	.915	0,284	.599	3,439	.032	15,450	< .001					
LH Duty Cycle (%)	0,244	.627	0,137	.716	1,272	.302	11,454	< .001					
Phase Dispersion RF→ RH	0,163	.693	21,505	< .001	0,307	.820	11,257	< .001					„Phase Dispersion“ ist ein Maß der Pfoten Koordination. Es beschreibt die in Prozent des Schrittzyklus ausgedrückte zeitliche Beziehung des Auftretens zweier Pfoten. Insgesamt zeigte sich bei Vehikeltieren keine signifikante Veränderung nach MCAo. Es gab jedoch einen Unterschied zwischen den Gruppen.
Phase Dispersion LF→ LH	0,012	.916	4,747	.053	0,805	.508	3,591	.037					
Support Single (%)	0,500	.492	2,238	.165	0,570	.646	40,777	< .001					Mit SARI45 behandelte Tiere schienen im Verlauf der Zeit häufiger während des Gangzyklus nur ein Bein zu belasten.
Base of Support Hind	0,056	.817	0,07	.937	0,843	.484	1,190	.335					Es zeigte sich kein Unterschied in der Trittbreite der Hinterpfoten.

3.5.5 Auswertung der MRT-gestützten Infarktvolumetrie im subakuten Stadium

Die MRT-gestützte Analyse der Infarktvolumina zu den Zeitpunkten 4, 10 und 28 Tage nach MCAo ergab nach Formel (2) und (3) (S. 37) bzw. (4) und (5) (S. 38) zum jeweiligen Zeitpunkt ähnliche Ergebnisse. Dies bestätigt die Validität des verwendeten Korrekturverfahrens (Formel (2) und (3), S. 37) zur Abschätzung der Infarktvolumina. Die Mittelwerte der Vehikelgruppe zu den genannten Zeitpunkten lagen bei $34 \pm 14 \%$, $27 \pm 11 \%$ bzw. bei $28 \pm 12 \%$ ($n = 7$ zum Zeitpunkt 4 Tage nach MCAo und $n = 6$ für alle übrigen Zeitpunkte). Damit lagen diese deutlich unter den erwarteten Werten. Es gilt zu beachten, dass 40 % der Tiere in der Vehikelgruppe vorzeitig verstarben, ohne dass die Größe der Infarkte gemessen werden konnte. Da diese Tiere aller Wahrscheinlichkeit nach größere Infarkte aufgewiesen hätten (siehe auch 3.4, S. 50) liegt womöglich eine Verzerrung der Ergebnisse vor. Die Ergebnisse in der Verumgruppe waren mit den bislang im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten gut vereinbar. Die Mittelwerte lagen bei $44 \pm 8 \%$, $38 \pm 8 \%$ bzw. bei $37 \pm 8 \%$ ($n = 9$ für alle Zeitpunkte). Insgesamt unterschieden sich die Mittelwerte der Vehikel- und der Verumgruppe nicht signifikant voneinander (lineares gemischtes Modell mit Messwiederholung für den Zwischensubjektfaktor „Gruppe“ $F(1, 15) = 2,737$, $p = .118$). Die Hypothese H_{15} wird daher abgelehnt.

3.6 Wirkung von SAR145 auf Mikroglia und Endothelzellkulturen

Wie in Abschnitt 1.2 (S. 7) dargestellt, stellt eine Modulierung der postischämischen Reaktion einen möglichen Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung von PPAR δ dar. Es sollte deshalb gezeigt werden, dass die durch LPS bzw. TNF α hervorgerufene Aktivierung von Mikroglia- und Endothelzellen mithilfe von SAR145 verringert werden kann.

3.6.1 Verringerung der Mikrogliaaktivierung durch SAR145

Die Aktivierung der Mikrogliazellen wurde nach 2.2.2.2 (S. 42) mithilfe des Griess-Tests bestimmt. Um zu überprüfen, ob SAR145 möglicherweise toxisch auf die Zellen wirkt und der Abfall der Aktivierung allein dadurch bedingt ist, wurde zudem der MTT-Test nach 2.2.2.2 durchgeführt. Für die Werte des Griess-Tests und des MTT-Test wurde jeweils eine ANOVA mit Tukey-HSD Post-hoc-Analyse durchgeführt. Für die Behandlung mit SAR145 in den Dosierungen 1 μM und 10 μM zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zur DMSO Kontrolle. Die Behandlung mit Dosen von 50 und 100 μM SAR145 führte sowohl zu einem signifikanten Abfall der Aktivierung (ANOVA; $F(4, 19) = 28,07$, $p < .0001$; Tukey-HSD Post-hoc: DMSO vs. 10 μM $p = .128$; DMSO vs. 50 μM $p < .0001$; DMSO vs. 100 μM $p < .0001$), als auch des MTT Wertes (ANOVA; $F(4, 19) = 13,581$ $p < .0001$; Tukey-HSD Post-hoc: DMSO vs.

10 μM $p = .963$; DMSO vs. 50 μM $p = .004$; DMSO vs. 100 μM $p < .0001$). Dies lässt vermuten, dass SAR145 in hoher Dosierung toxisch wirkt und auch dadurch die NO-Produktion beeinflusst. Da das Ergebnis des MTT-Tests somit wahrscheinliche keine unabhängige Kovariate für das Maß der Aktivierung ist, ist eine statistische Auswertung der Ergebnisse des Griess-Tests schwierig. Es fällt jedoch auf, dass es bei einer Behandlung mit SAR145 in einer Dosierung von 10 μM zu einer Reduktion der Aktivierung um 30 % bei einem Abfall des MTT-Werts von lediglich 7 % kommt. Diese Reduktion war jedoch statistisch nicht signifikant. Formal statistisch wird Hypothese H_{16} (S. 21) jedoch angenommen.

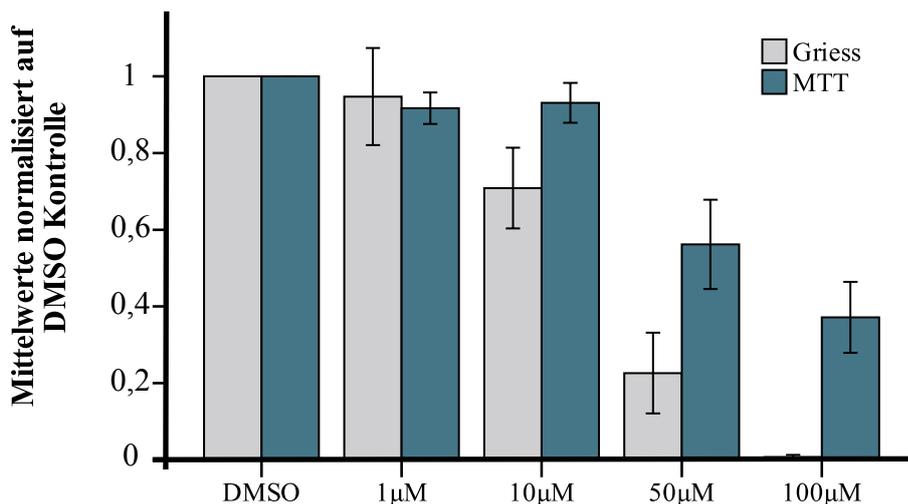


Abb. 3.11: Effekte der Behandlung mit SAR145 auf die Mikrogliaaktivierung durch LPS

Primäre Mikrogliazellen wurden mit 100 ng/ml LPS in der Anwesenheit von DMSO oder SAR145 in angegebener Konzentration stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von fünf Experimenten. Die Werte jedes Experiments wurden auf die jeweilige stimulierte und mit DMSO behandelte Gruppe normalisiert.

3.6.2 Verringerung der ICAM-1-Expression auf bEnd.3 Zellen

Die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen gilt als Maß für deren Aktivierung^{183,184} und spielt eine wichtige Rolle in der inflammatorischen Kaskade nach einem ischämischen Ereignis. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde deshalb eine mögliche Reduktion der ICAM-1-Expression auf zerebralen Mausendothelzellen durch SAR145 nach einem proinflammatorischen Stimulus ($\text{TNF}\alpha$) untersucht. In der nicht stimulierten Gruppe zeigte sich kein Unterschied in der ICAM-1-Expression zwischen den Behandlungsgruppen (Anteil hoch ICAM-1-exprimierender Zellen bei $2,5 \pm 0,9$ %; Abb. 3.12 A-D hellblau schattiert, S. 63.). Nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ wurde ein deutlicher Anstieg des Anteils der hoch ICAM-1-exprimierenden Zellen (Abb. 3.12 A rot schattiert, S. 63) beobachtet. Dieser Anstieg hoch ICAM-1-exprimierender Zellen konnte

Ergebnisteil

durch die Behandlung mit SAR145 dosisabhängig verringert werden (ANOVA; $F(2, 3) = 68,8$, $p = .003$; Tukey-HSD Post-hoc: DMSO vs. $25 \mu\text{M}$ $p = .022$; DMSO vs. $100 \mu\text{M}$ $p = .003$) Ähnlich wie in den Experimenten an Mikrogliazellen wurde allerdings ein vermutlich toxischer Effekt von SAR145 in hoher Dosierung beobachtet. Der Anteil der mittels DAPI-Färbung als lebend identifizierten Zellen sank von im Mittel $87 \pm 1 \%$ in den mit DMSO, $1 \mu\text{M}$ und $25 \mu\text{M}$ SAR145 behandelten Populationen auf $67 \pm 0,1 \%$ bei mit $100 \mu\text{M}$ SAR117145 behandelten Zellen (ANOVA $F(2, 3) = 290,8$, $p < .0001$; Tukey-HSD Post-hoc: DMSO vs. $25 \mu\text{M}$ $p = .976$; DMSO vs. $100 \mu\text{M}$ $p < .0001$) Dies macht eine eindeutige Interpretation des vorliegenden Ergebnisses ebenfalls schwierig. Zudem handelt es sich bei den vorliegenden Daten um lediglich ein Experiment mit zweifacher Replikation der DMSO, $25 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ Gruppe, jedoch nur einem Wert für die $1 \mu\text{M}$ Gruppe. Die Hypothese H_{17} (S. 21) wird angenommen.

Ergebnisteil

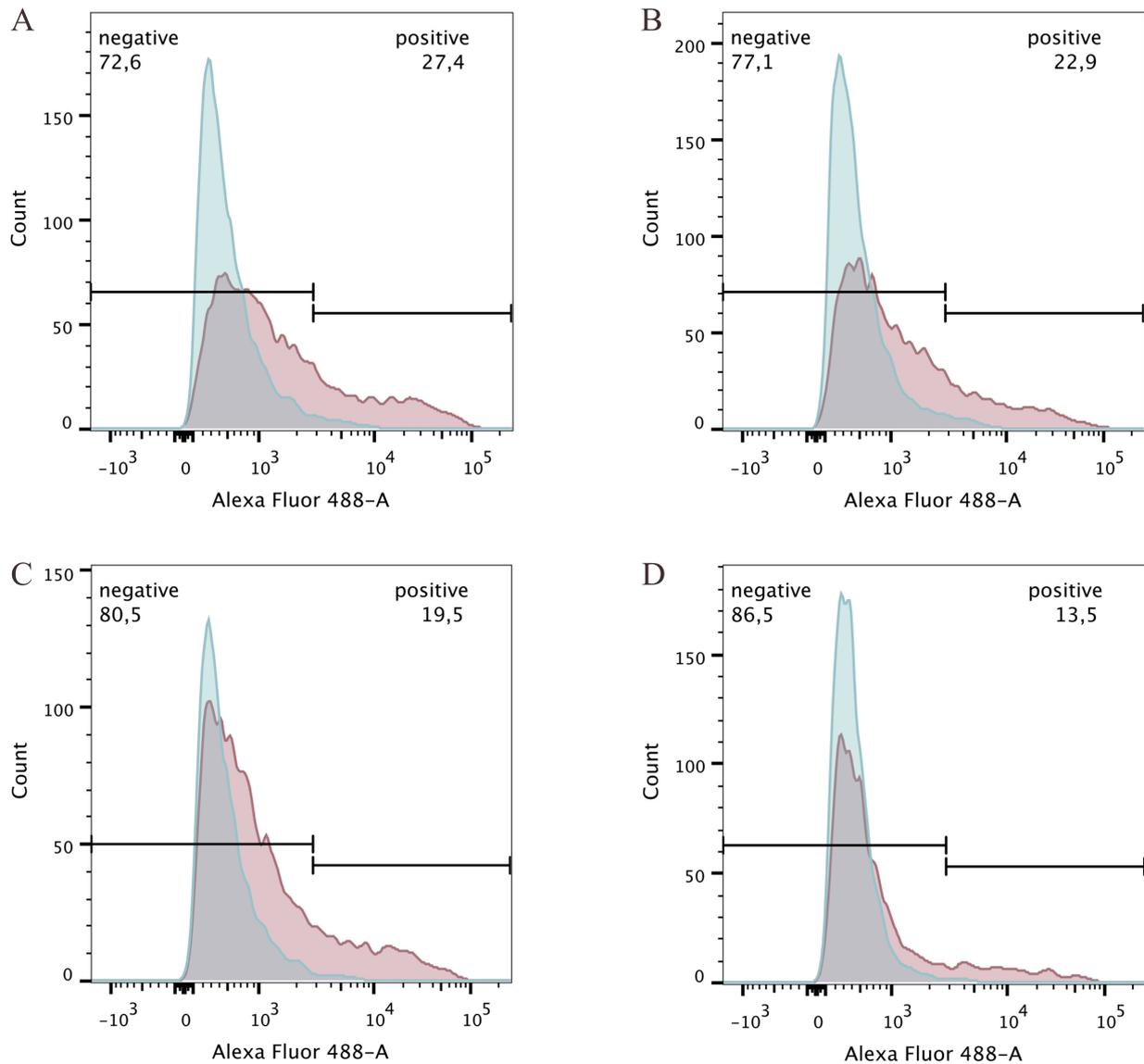


Abb. 3.12: Repräsentative Ergebnisse der ICAM-1-Expression auf bEnd.3 Zellen mit und ohne Stimulation durch $TNF\alpha$ und Behandlung mit SAR145

Durchflusszytometrische Analyse der ICAM-1-Expression auf bEnd.3 Zellen nach Stimulation und Behandlung mit SAR145 in unterschiedlichen Dosierungen (rot schattiert). In blauer Schattierung dargestellt ist die jeweilige nicht stimulierte Kontrolle. Außerdem angegeben ist die Prozentzahl der für eine hohe ICAM-1-Expression positiven und negativen Zellen. (A) DMSO, (B) 1 μ M SAR145, (C) 25 μ M SAR145, (D) 100 μ M SAR145.

4. Diskussion

Die Inzidenz des Schlaganfalls wird aufgrund der demographischen Entwicklung in den kommenden Jahrzehnten stark ansteigen. Der Druck auf die medizinische Forschung, eine effektive Therapie für diese mit schwerer Behinderung einhergehende und häufig tödliche Erkrankung zu finden, ist daher groß. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die bisherigen vielversprechenden Ergebnisse für eine Behandlung mit PPAR δ -Agonisten im Schlaganfallmodell zu ergänzen, um bisher offene Fragen zu klären, die einer Weiteruntersuchung dieser Substanzklasse in klinischen Studien im Wege stehen. Durch Verwendung eines neuartigen PPAR δ -Agonisten, der eine gute orale Bioverfügbarkeit aufweist, konnte die für die Klinik sehr viel besser geeignete orale Gabe genutzt werden. Bis zum Zeitpunkt des Studienbeginns (2013) erfolgte die Gabe ausschließlich intrathekal. Zudem sollte erstmals die Gabe in einem für die Klinik relevanten Zeitfenster mehrere Stunden nach Beginn der Ischämie getestet werden. Erstmals sollte auch der Effekt einer Behandlung mit einem PPAR δ -Agonisten auf das funktionelle Endergebnis in einem erweiterten Untersuchungszeitraum von 28 Tagen bestimmt werden, um eine Aussage über das für klinische Studien vor allem bedeutsame langfristige Endergebnis treffen zu können. Da gezeigt werden konnte, dass Substanzen, für die eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt werden konnte, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit auch in klinischen Studien erfolgreich waren,¹⁸⁵ sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit vier unterschiedlichen Dosierungen erstellt werden.

Zusätzlich sollten die Versuche in Übereinstimmung mit den STAIR-Richtlinien randomisiert und verblindet durchgeführt werden. Unter Anwendung dieser Kriterien zur Sicherung der Studienqualität konnte für keine verwendete Dosierung und zu keinem Zeitpunkt der Zeitfensterstudie ein statistisch signifikanter neuroprotektiver Effekt von SAR145 nachgewiesen werden. Auch die Verhaltenstestung über 28 Tage und die Bestimmung der Infarktgröße in diesem erweiterten Beobachtungszeitraum konnten keine neuroprotektive Wirkung belegen.

4.1 Diskussion und Interpretation der eigenen Ergebnisse

Im Folgenden sollen mögliche Erklärungen für diese Ergebnisse diskutiert werden. Mögliche Erklärungen für die Ablehnung der Alternativhypothesen beziehen sich auf die verwendete Substanz und deren Anwendung sowie die verwendeten Methoden.

- (1) Die einfachste Erklärung für das Versagen einer neuartigen, bisher nicht verwendeten Substanz innerhalb einer bekannten Substanzklasse, ist das Versagen dieser spezifischen Substanz, ohne dass dies zu einer Aussage über die gesamte Substanzklasse berechtigen würde. Im vorliegenden Fall würde das bedeuten, dass SAR145 entweder bei oraler Gabe nicht in ausreichender Dosis an seinen Wirkort gelangt, oder womöglich gar nicht am PPAR δ wirkt.
- (2) Die zweite Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die Substanz zwar am PPAR δ wirkt, eine Aktivierung des Rezeptors im untersuchten Zeitfenster jedoch keine neuroprotektive Wirkung besitzt.
- (3) Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Substanz am PPAR δ wirkt und auch im untersuchten Zeitfenster zu einer Neuroprotektion führt, diese im Vergleich zur bisher untersuchten Vorbehandlung mit PPAR δ -Agonisten jedoch eine geringere Effektivität besitzt und daher die verwendeten Methoden mit den verwendeten Gruppengrößen keine ausreichende Power besitzen um diese Effekte zuverlässig darstellen zu können. Dazu gehört auch, dass *Bias* und Ungenauigkeiten in der Anwendung der Methoden zum Verlust des Effekts geführt haben können.

Da in der vorliegenden Untersuchung im Gegensatz zu bisherigen Veröffentlichungen keine deutliche neuroprotektive Wirkung von PPAR δ -Agonisten gezeigt werden konnte, sollen im Anschluss Unterschiede zwischen der vorliegenden und den bisher publizierten Studien diskutiert werden, die zu dieser Diskrepanz geführt haben könnten (siehe 4.2, S. 78).

4.1.1 Ziel der Studie - hypothesenbestätigend oder hypothesengenerierend?

Um die Ergebnisse einer Studie interpretieren zu können, ist die Kenntnis des Ziels der Arbeit von zentraler Bedeutung. Aus diesem Grund schlugen Kimmelman et al.¹⁸⁶ vor, zwischen hypothesenbestätigenden und hypothesengenerierenden Arbeiten (*confirmative vs. exploratory research*) zu unterscheiden. Eine hypothesengenerierende Arbeit sollte eine hohe Sensitivität besitzen, um ein mögliches Signal zu detektieren. Flexibilität in den Fragestellungen und der Auswertung sind grundlegender Bestandteil dieser Art von Arbeit. Eine hypothesenbestätigende Arbeit sollte dagegen eine hohe Spezifität besitzen. Voraussetzungen hierfür sind das Befolgen eines vordefinierten Studienprotokolls und eine klare Fragestellung. Diese dichotome Unterteilung kann jedoch nicht die Komplexität des Prozesses von der Entdeckung eines Wirkmechanismus bis zum in der Klinik einsetzbaren Medikament abbilden. Vielmehr sollte sich die Phase der Hypothesengenerierung in aufeinander aufbauende, sich immer mehr an die

Methoden hypothesenbestätigender Arbeiten angleichende Einzelschritte gliedern. Dieses so generierte Wissen kann dann in hypothesenbestätigenden Arbeiten überprüft werden. Vor der Durchführung hypothesenbestätigender Studien stehen Wirksamkeitsstudien (*efficacy studies*), die unter Annahme bereits beobachteter Wirkmechanismen die Wirksamkeit einer Substanz im Tiermodell untersuchen. Im Gegensatz zu hypothesenbestätigenden Arbeiten erlauben Wirksamkeitsstudien noch ein höheres Maß an Flexibilität bei Gruppengröße, Dosierung und Behandlungszeitpunkt. Davon abgesehen sollten sie sich jedoch weitgehend an den für hypothesenbestätigende Studien geforderten Qualitätskriterien orientieren. Ziel dieser Wirksamkeitsstudien ist es, mit einer größeren Anzahl kleinerer Gruppen möglichst viel Information zum Behandlungsregime und zu den erwartenden Effektgrößen zu sammeln, um diese Information in einer hypothesenbestätigenden Studie mit deutlich weniger, dafür aber deutlich größeren Gruppen zu bestätigen. Die untersuchten Gruppen in Wirksamkeitsstudien sind daher naturgemäß für verlässliche statistische Inferenzen weder groß genug, noch werden die für Inferenzstatistik geforderten Voraussetzungen erfüllt. Es wird deshalb empfohlen, in hypothesengenerierenden Arbeiten die Inferenzstatistik durch eine rein deskriptive Datenanalyse zu ersetzen.

Die eigene Arbeit lässt sich als Wirksamkeitsstudie, also als hypothesengenerierende Arbeit einordnen. Vor diesem Hintergrund sind auch die verwendeten statistischen Methoden kritisch zu sehen und sollten vielmehr durch eine rein deskriptive Datenanalyse ersetzt werden. Aus Gründen der Konvention wurden jedoch statistische Methoden verwendet, die für eine hypothesenbestätigende Arbeit empfohlen werden.¹⁸²

4.1.2 Wirkung von SAR145 am Zielort

Ob SAR145 ein selektiver PPAR δ -Agonist ist, war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, weshalb Erklärungsmöglichkeit (1) (S. 65) nicht anhand eigener Daten vollständig ausgeschlossen werden kann. Dennoch ist anzunehmen, dass diese Erklärung äußerst unwahrscheinlich ist. Ausführliche Studien mit *Reporter Gene Assays* durch den Hersteller der Substanz zeigten sowohl für den humanen, als auch den murinen PPAR δ voll agonistische Eigenschaften und eine mindestens 150-fache Selektivität für PPAR δ im Vergleich zu PPAR α und keine Aktivität am PPAR γ . Auch die Selektivität im Vergleich zu 23 nukleären Hormonrezeptoren und 98 Wirkstoffzielen wurde untersucht. Es ergab sich lediglich eine schwache Aktivierung des *pregnant x receptors* (PXR) als partieller Agonist. Daten des Herstellers belegen auch eine ausreichende orale Bioverfügbarkeit der Substanz und eine für die einmal tägliche Gabe günstige Halbwertszeit im Hirngewebe von 23 h (Sanofi, unveröffentlichte

Daten). Um die Verfügbarkeit der Substanz im Gehirn in der in dieser Arbeit verwendeten Präparation und Applikation zu bestätigen, wurden drei Tiere über sieben Tage behandelt und anschließend die Konzentration der Substanz im Gehirn massenspektrometrisch bestimmt (siehe 3.2, S. 47). Nach Rücksprache mit dem kommerziellen Partner, der die Messung durchführte, ist aufgrund der sehr hohen Spezifität der verwendeten Messmethode ein Vergleich zu den nur mit Vehikel behandelten Tieren nicht zwingend notwendig. Einzuwenden ist, dass diese Versuche nur an MCAo-naiven Tieren durchgeführt wurden. Allerdings ist durch das Zusammenbrechen der Blut-Hirn-Schranke eher mit einer besseren Penetration der Substanz in das Hirngewebe nach MCAo zu rechnen. Die Ergebnisse der Messung stimmten gut mit den von Sanofi berichteten Werten überein (siehe 2.1.8, S. 27).

Ein weiterer Hinweis für eine Wirkung der Substanz am PPAR δ kommt aus der Langzeitbeobachtung der Tiere. Die Tiere zeigten bei Behandlung über einen längeren Zeitraum eine wahrscheinlich für PPAR δ -Agonisten spezifische Nebenwirkung (s. Abschnitt 4.1.4, S. 72). Wie schon in 1.2.1 (S. 10) beschrieben ist PPAR δ an der Regulation der Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten beteiligt. Die Behandlung mit einem PPAR δ -Agonisten kann zur Ausbildung von psoriasiformen Schwielen an der Haut führen.¹⁰⁹ In der Tat zeigten die Tiere in der Langzeitbeobachtung ebensolche Schwielen an den Pfoten. Allerdings fehlt eine detaillierte Charakterisierung der beobachteten Hautveränderung, sodass deren Herkunft nicht abschließend geklärt ist.

Letztendlich ist jedoch eine PPAR δ -selektive Wirkung der verwendeten Substanz im Gehirn anzunehmen.

4.1.3 Einfluss von PPAR δ auf die Infarktgröße

4.1.3.1 Dosis-Wirkungs-Kurve und Zeitfensterstudie

Im Jahr 2006 veröffentlichten O'Collins et al. eine Übersicht über 1026 bis zu diesem Zeitpunkt auf ihre neuroprotektive Wirkung untersuchten Substanzen.³⁷ Diese Substanzen zeigten eine mittlere Reduktion der Infarktgröße um 25 %. Aufgrund der zuvor berichteten Reduktion der Infarktgröße von bis zu 41 %¹⁴⁸ durch PPAR δ -Agonisten wurde bei der Planung der vorliegenden Studie von einer Reduktion von 30 % ausgegangen. Auch wenn weder in der Analyse der Daten der Dosis-Wirkungs-Kurve noch in der Zeitfensterstudie ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Vehikelgruppe und Verumgruppe festgestellt werden konnte, und die Hypothesen H₁1 und H₁2 abgelehnt werden mussten, zeigte sich doch in allen mit 10 mg/kg KG zum Zeitpunkt der Reperfusion behandelten Gruppen eine Reduktion der

Diskussion

Infarktgröße von im Mittel 18 ± 10 %. Dieser in drei unabhängigen Gruppen gefundene Effekt war sowohl von der Dosierung als auch vom Zeitpunkt der Gabe abhängig. Nur in einem schmalen Dosisbereich zwischen 10 mg/kg KG und 30 mg/kg KG und einem engen Zeitfenster bis drei Stunden nach MCAo zeigten sich vergleichbare Effekte. Angenommen, der beobachtete Effekt würde dem tatsächlichen Effekt entsprechen, so bräuchte man bei der erreichten Standardabweichung eine Stichprobengröße von 245 Tieren, um ihn bei einem angestrebten $\alpha = .05$ in einem Experiment mit einer akzeptablen Power von 0,8 zu untersuchen. War der Effekt des PPAR δ -Agonisten im untersuchten Zeitfenster also womöglich zu gering, um ihn mit der verwendeten Gruppengröße zu detektieren? Vorarbeiten berichteten bei Behandlung mit einem selektiven PPAR δ -Agonisten vor MCAo eine signifikante Reduktion der Infarktgröße um 35-44 %.^{147,148,152} Allerdings fand Iwashita 2006 bei intrathekaler Vorbehandlung mit dem selektiven PPAR δ -Agonisten L165041 24 h vor MCAo nur bei getrennter Betrachtung von kortikalem und subkortikalem Infarkt eine signifikante Reduktion der Infarktgröße. Betrachtet man hingegen den gesamten Infarkt, so ergibt sich eine maximale Reduktion der Infarktgröße von lediglich 18 %.¹⁴⁷ Ob in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduktion der Infarktgröße bei alleiniger Betrachtung des subkortikalen Infarkts vorliegt, wurde nicht analysiert. Es ist zudem fraglich, ob eine Differenzierung in kortikalen und subkortikalen Infarkt in einem proximalen Schlaganfallmodell die Aussagekraft insbesondere in Hinblick auf die Translation in klinische Studien nicht vermindern würde. Eine Analyse der gepoolten eigenen Daten wurde durchgeführt, um zu ermitteln, ob eine veränderte Versuchsplanung mit größerer Ähnlichkeit zu den Vorarbeiten^{148,152} mit einem Direktvergleich von einer einzelnen Verumgruppe (Behandlung nur in einer Dosierung und nur zu einem einzelnen Zeitpunkt) mit einer Vehikelgruppe formal statistisch zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße geführt haben könnte. Dazu wurden alle identisch operierten und behandelten Tiere der Verum- (n = 29) und der Vehikelgruppe (n = 40) gepoolt. Es ergab sich eine statistisch signifikante Reduktion des Infarktvolumens um 19 % (Infarktgröße Vehikelgruppe 46 ± 14 %; Infarktgröße Verumgruppe 37 ± 15 %; zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben $p = .011$). Da es sich dabei jedoch um eine eigentlich unzulässige Post-hoc-Analyse handelt, haben diese Ergebnisse keine entscheidende Aussagekraft, stellen sie jedoch in Zusammenhang zu den bisher durchgeführten Studien. Ein offensichtlicher Unterschied zu den Vorarbeiten liegt im Zeitpunkt und der Art der Behandlung mit der Substanz. Im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Studien mit PPAR δ -Agonisten in einem Modell zerebraler Ischämie^{147,148,152} wurden die Tiere nicht vor MCAo, sondern frühestens zum Zeitpunkt der Reperfusion behandelt. Zudem zeigt die orale

Diskussion

Gabe im Vergleich zur bisher verwendeten intrathekalen oder intraperitonealen Gabe ein verzögertes Anfluten der Substanz im Gehirn. Der Zeitpunkt der Bioverfügbarkeit am Zielort unterschied sich daher deutlich von den Vorarbeiten. Versuche mit PPAR δ -Knock-out-Tieren deuten darauf hin, dass PPAR δ schon in den ersten 30 min nach MCAo einen signifikanten Effekt auf die Infarktgröße haben könnte.¹⁴⁶ Eine Behandlung mit einem PPAR δ -Agonisten zu einem späteren Zeitpunkt könnte daher keinen oder einen deutlich geringeren Effekt haben.

Ein zweiter wichtiger Einflussfaktor auf das erreichte Signifikanzlevel α und die Power β einer Studie ist die Streuung der Daten. Die a priori angenommene Standardabweichung von 25 % konnte in der Studie nicht eingehalten werden, sodass die kalkulierte Gruppengröße auch dadurch zu niedrig angesetzt war. Die Standardabweichungen in den verschiedenen Gruppen liegen jedoch weitgehend im Rahmen der für das verwendete Modell erwarteten Standardabweichung von bis zu 40 %.¹⁸⁷

Die Standardabweichungen in dieser Studie sind untersucherabhängigen und untersucherunabhängigen Faktoren geschuldet. Maßgebend sind Technik und Erfahrung des durchführenden Experimentators. In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Versuche stets vom selben Experimentator durchgeführt, um Unterschiede in der Durchführung zu minimieren. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um die erste MCAo-Studie des Experimentators handelt, ist trotz vorausgegangenen ausführlichen Trainings und Qualitätskontrollen nicht auszuschließen, dass sich im Verlauf der Arbeit die Technik des Experimentators weiter verbesserte. Um sicherzustellen, dass die von dem Experimentator verwendete Technik zuverlässig zu einer Flussreduktion von $> 85\%$ in der MCA führt, wurde vor Beginn der Studie in einer Gruppe von sechs Tieren der Blutfluss im Stromgebiet der MCA über den Verlauf des Experiments mithilfe der Laser-Doppler-Flussmessung aufgezeichnet (siehe 3.1, S. 47). Allerdings kann mit der Laser-Doppler-Flussmessung nur der Fluss in einem kleinen Areal des MCA Stromgebiets gemessen werden, sodass insbesondere der Fluss in der Penumbra nicht beurteilt werden kann. Zudem wurde der Fluss in den Behandlungsstudien nicht gemessen, da die Laser-Doppler-Flussmessung mit einer deutlichen Verlängerung der Operationszeit einhergeht. Vielmehr wurde darauf geachtet, die Operationsdauer so niedrig wie möglich zu halten, um den Einfluss intrinsischer neuroprotektiver Effekte des verwendeten Narkotikums Isofluran¹⁸⁸ als weitere mögliche Störgröße so gering wie möglich zu halten. So konnte eine mittlere Operationsdauer von 12 ± 3 min erreicht werden.

Unabhängig vom Untersucher zeigt das verwendete 45 min MCAo-Modell in C57Bl/6 Mäusen eine hohe Varianz der Infarktgrößen. C57Bl/6 Mäuse besitzen im Gegensatz zu anderen

Diskussion

Mausstämmen, beispielsweise SV-129 Mäusen, eine deutliche höhere Varianz im Grad der Ausprägung des Circulus arteriosus Willisii und damit der möglichen Kollateralversorgung, die einen deutlichen Einfluss auf die Infarktgröße hat.^{189,190} Da die verwendeten PPAR δ -Knock-out-Tiere jedoch mit C57BL/6 Tieren rückgekreuzt wurden, wurden auch in den Wildtypgruppen C57BL/6 Tiere verwendet, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Während bei der Verwendung eines 30 min MCAo-Modells nahezu ausschließlich striatale Infarkte zu erwarten sind, führt ein 60 minütiger Verschluss der MCA in C57BL/6 Mäusen reproduzierbar zu holohemisphärischen Infarkten.¹⁹¹ Die Wahl einer 45 minütigen Verschlusszeit, die je nach Ausprägung der Kollateralen sowohl zu rein striatalen als auch holohemisphärischen Infarkten führen kann, könnte so insbesondere im verwendeten Mausstamm zu einer größeren Varianz der Infarktgrößen geführt haben. Trotzdem sind die Mittelwerte in drei unabhängigen Vehikelgruppen, sowie drei unabhängigen, identisch behandelten Verumgruppen (10 mg/kg KG zum Zeitpunkt der Reperfusion) weitestgehend konsistent ($46 \pm 3 \%$ bzw. $38 \pm 4 \%$).

Es muss angemerkt werden, dass auch individuelle Fehler in einigen Gruppen zu einer Vergrößerung der Streuung der Daten beigetragen haben können. So wurde die Gruppe der mit 100 mg/kg KG SAR145 behandelten Tiere aus technischen Gründen ohne den sonst verwendeten stereotaktischen Rahmen operiert. Auch ein Teil der Vehikelgruppe und der Gruppe der mit 1 mg/kg KG behandelten Tiere wurde ohne Rahmen operiert. Da ohne den Rahmen operierte Tiere tatsächlich kleinere Infarkte aufzuweisen schienen, kann dies durchaus zur einer erhöhten Varianz in diesen Gruppen geführt haben (siehe auch 3.3.1, S. 47). Es wurde jedoch keines der vorher definierten Ausschlusskriterien erfüllt, sodass diese Tiere nicht von der Analyse der Daten ausgeschlossen wurden. Ebenfalls anzumerken ist, dass die Versuche der Dosis-Wirkungs-Studie und der Zeitfensterstudie aus organisatorischen Gründen den STAIR-Richtlinien nicht vollständig folgen konnten. So war der Operateur in diesen beiden Versuchen nicht für die Gruppenzugehörigkeit verblindet und von den empfohlenen physiologischen Parametern wurde lediglich die Temperatur überwacht und kontrolliert. Bei Auswertung der Infarktgröße war der Untersucher wie auch bei allen anderen Versuchen jedoch verblindet für die Zugehörigkeit zu einer Behandlungsgruppe (siehe auch 2.2.1.1, S. 28). Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass Maßnahmen zur Reduktion von *bias*, wie die Verblindung des Operateurs für die Gruppenzugehörigkeit, eher zu einer Verkleinerung der beobachteten Effektgröße führen.^{192,193} Bei der Zeitfensterstudie hätte zudem der Verumgruppe zu jedem Zeitpunkt eine Vehikelgruppe gleicher Größe gegenübergestellt werden müssen. Da

sich kein offensichtlicher Unterschied in den Infarktgrößen der Vehikeltiere zeigte, wurden die Vehikelgruppen der Zeitfensterstudie im vorliegenden Fall gepoolt, um einen *bias* durch eine zu kleine Gruppengröße zu vermeiden.

4.1.3.2 PPAR δ -Knock-out

Vorarbeiten an PPAR δ -Knock-out-Tieren zeigten in einem permanenten distalen MCAo-Modell eine Vergrößerung des Infarkts um das 1,3- bis zweifache im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen.^{145,146} Dabei konnte in der MRT ein Unterschied in der Infarktgröße schon 30 min nach MCAo nachgewiesen werden.¹⁴⁶ Wie oben bereits erwähnt, deutet dies entweder auf einen Einfluss des PPAR δ in der frühen postischämischen Phase oder aber auf strukturelle Unterschiede wie eine veränderte Blutversorgung in den PPAR δ -Knock-out-Tieren hin. Tatsächlich zeigt sich in PPAR δ -Knock-out-Tieren schon in der frühen Entwicklungsphase eine gestörte Gefäßentwicklung¹⁹⁴ und PPAR δ ist an der Steuerung der Angiogenese beteiligt.¹⁹⁵ Allerdings berichteten Arsenijevic et al., keine Unterschiede in der zerebralen Gefäßarchitektur zwischen Wildtyp und Knock-out-Tieren gefunden zu haben.¹⁴⁵

In der vorliegenden Studie zeigten Knock-out-Tiere eine signifikant höhere Mortalität als die zeitgleich operierten Wildtyp-Tiere. Bei der Interpretation der zugehörigen Infarktgrößen ist diese deutlich erhöhte Mortalität der Knock-out-Tiere von entscheidender Bedeutung. Wie in 3.4 (S. 50) dargestellt, zeigten Tiere der Knock-out-Gruppen, die aufgrund des Auftretens von Abbruchkriterien vorzeitig aus dem Versuch genommen werden mussten, größere Infarkte als Tiere, die nach 72 h dekapitiert wurden. Deshalb ist davon auszugehen, dass auch vorzeitig verstorbene Tiere (25 % der Knock-out-Vehikelgruppe und 20 % der Knock-out-Verumgruppe), deren Gehirne nicht asserviert werden konnten, größere Infarkte aufgewiesen hätten. Da die Infarktgrößen dieser Tiere jedoch nicht bestimmt werden konnten, liegt eine Selektion von Tieren mit kleineren Infarkten und damit einer Verzerrung der Ergebnisse vor. Die vorliegenden Ergebnisse deuten also darauf hin, dass Knock-out-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren größere Infarkte aufweisen. Den experimentellen Nachweis kann jedoch nur ein Infarktmodell mit einer geringeren Mortalität in den Knock-out-Gruppen bringen, bei dem die Infarktgrößen aller Tiere im Vergleich zu einer Wildtyp-Kontrollgruppe bestimmt werden könnten.

Im Vergleich der Behandlungsgruppen zeigten Tiere der Knock-out-Verumgruppe etwas größere Infarkte als Tiere der Knock-out-Vehikelgruppe. Es kann jedoch sowohl bezüglich der Mortalität als auch der Infarktgröße in beiden Gruppen von vergleichbaren Ergebnissen gesprochen werden. In der gleichzeitig operierten Wildtyp-Verumgruppe zeigte sich hingegen eine Reduktion der Infarktgröße von 28 % im Vergleich zur Wildtyp-Vehikelgruppe. Dieser

Unterschied war, wahrscheinlich aufgrund der kleinen Gruppengrößen und der hohen Standardabweichung, statistisch nicht signifikant. Bei den verwendeten Wildtyp-Tieren handelte es sich jedoch nicht um Wurfgeschwister der Knock-out-Tiere, sodass ein Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen nicht mit endgültiger Sicherheit alleine auf das Fehlen des PPAR δ zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz zu den Versuchen zur Dosis-Wirkungs-Kurve und der Zeitfensterstudie war der Operateur bei den Versuchen mit Knock-out-Tieren und den Wildtyp-Kontrollen verblindet für den Genotyp und die Behandlungsgruppe der Tiere. Auch hier wurde jedoch nur die Körpertemperatur überwacht.

Insgesamt weisen die vorliegenden Ergebnisse auf eine Rolle von PPAR δ für die Folgen eines Schlaganfalls im 45 min MCAo-Modell hin. Vor allem die erhöhte Mortalität in den Knock-out-Gruppen und der unterschiedliche Effekt des PPAR δ -Liganden auf Knock-out und Wildtyp-Tiere legen dies nahe. Allerdings kann dies aus oben genannten Gründen statistisch nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls kann nicht geklärt werden, ob der erhöhten Mortalität der PPAR δ -Knock-out-Tiere und dem angenommenen schwachen neuroprotektiven Effekt einer Aktivierung des PPAR δ die gleichen Mechanismen zugrunde liegen. Ob Erklärungsmöglichkeit (2) oder (3) (S. 65) zutrifft, können die Versuche somit nicht abschließend beantworten. Die Ergebnisse stehen dennoch in deutlichem Widerspruch zu bisher veröffentlichten Arbeiten, die einen substantziellen neuroprotektiven Effekt bei Behandlung mit PPAR δ -Agonisten in Modellen zerebraler Ischämie berichten. Bevor auf diese Thematik weiter eingegangen wird, sollen zunächst die Ergebnisse der Verhaltensanalysen und in vitro Studien diskutiert werden.

4.1.4 Einfluss von PPAR δ -Agonisten auf das funktionelle und morphologische Endergebnis

Die vorliegende Arbeit ist die erste Arbeit, die den Einfluss einer Behandlung mit einem PPAR δ -Agonisten auf das funktionelle Endergebnis bei einer Beobachtung über einen längeren Zeitraum untersucht. Bisherige Studien untersuchten das funktionelle Endergebnis entweder nicht, oder benutzten lediglich einen einfachen neurologischen Score. Einfache neurologische Scores, wie der Bederson-Score oder der von Longa entwickelte 5-Punkte-Score, sind jedoch weder hierfür entwickelt worden, noch sind sie validiert, das funktionelle Endergebnis zu bestimmen.^{157,196} Die alleinige Anwendung des Bederson-Scores zur Evaluierung des funktionellen Endergebnis nach einer Behandlung mit NXY-059 im MCAo-Modell¹⁹⁷ wurde auch als ein möglicher Grund für die Diskrepanz zwischen erfolgreicher präklinischer Testung der Substanz und fehlendem Erfolg in klinischen Studien genannt.¹⁹⁸ Aus diesem Grund sollte

das funktionelle Endergebnis unter Anwendung zuvor beschriebener und für das MCAo-Mausmodell validierter Verhaltenstest¹⁶⁰ durchgeführt werden.

In keinem der Verhaltenstests zeigte sich eine funktionelle Verbesserung durch eine Behandlung mit SAR145 im Vergleich zur Vehikelgruppe. Hypothese H₁₄ (S. 20) wurde deshalb abgelehnt. Es konnte jedoch ein deutlicher und statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und der Vehikelgruppe in der Ganganalyse festgestellt werden. Die Interpretation dieser Daten ist äußerst komplex und wird auch dadurch erschwert, dass keine *scheinoperierten* Kontrollgruppen vorliegen, die eine klare Differenzierung von Effekten erlauben würde, die alleine durch die langfristige Behandlung mit dem PPAR δ -Agonisten begründet sind. Es soll deshalb zunächst untersucht werden, was im Gegensatz zu den Ergebnissen in allen anderen Verhaltenstest zu einem so deutlichen Gruppenunterschied in der Ganganalyse geführt haben könnte.

Bei der Erhebung der CatWalk-Daten fiel auf, dass im Verlauf der Zeit bei einigen Tieren die Aufnahme der Pfotenabdrücke immer schwieriger wurde. Es lag kein Gewichtsunterschied oder Unterschied in der Laufgeschwindigkeit vor, vielmehr schien es, als liefen die Tiere auf „Zehenspitzen“. Bei genauerer Untersuchung zeigten sich scheinbar hyperkeratotische Schwielen an den Pfoten der Tiere. Nach Auswertung aller Daten und Entblindung stellte sich heraus, dass alle auffälligen Tiere zur Verumgruppe gehörten. Die Datenlage zur Rolle von PPAR δ in der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Keratinozyten, sowie in Entzündungsreaktionen in der Haut ist widersprüchlich. Die ersten Untersuchungen dazu zeigten eine erhöhte Proliferation von Keratinozyten in PPAR δ -Knock-out-Tieren.⁹⁴ Später konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des PPAR δ antimitotisch, antiapoptotisch und über eine vermehrte Ausschüttung von IL-1ra auch antiinflammatorisch wirkt.¹⁰⁷ Im Widerspruch dazu stehen Arbeiten, die zwar ebenfalls eine PPAR δ -vermittelte antiapoptotische Wirkung fanden, jedoch eher eine proinflammatorische Wirkung über eine gesteigerte Aktivierung von NF- κ B und dadurch eine vermehrte Ausschüttung von IL-1 und MMP-9,¹¹⁰ bzw. proliferatorische Effekte und keine NF- κ B-vermittelte Wirkung berichten.¹⁹⁹ Die durch eine Behandlung mit GW501516 vermehrte Proliferation zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.²⁰⁰ Dabei beobachteten die Autoren bei systemischer Applikation des PPAR δ -Agonisten eine Verdickung der Haut und eine Hyperkeratose insbesondere an mechanisch beanspruchten Stellen, allerdings nur bei gleichzeitiger transgener Expression des humanen PPAR δ in Talgdrüsen. Ähnliches berichteten Hack et al. in einer Arbeit, die die spezifische Hemmbarkeit

Diskussion

dieser Hauterscheinungen durch PPAR δ -Antagonisten untersuchte.¹⁰⁹ Die genauen Effekte einer PPAR δ -Aktivierung in der Haut und inwieweit diese auf andere Organe, wie z. B. das Gehirn, übertragbar sind, ist weiterhin unklar. Vor diesem Hintergrund scheint es jedoch plausibel, dass Veränderungen der Haut zu den im CatWalk beobachteten Auffälligkeiten geführt haben könnten. Aufgrund der dadurch stark gestörten Detektierbarkeit der Pfotenabdrücke sind die Ergebnisse der CatWalk-Untersuchung für eine Beantwortung der Frage nach einem Unterschied im funktionellen Endergebnis zwischen den Behandlungsgruppen nicht zu verwerten.

Auch wenn sich dieser klare Unterschied zwischen den Gruppen in den anderen Verhaltensanalysen nicht beobachten lässt, so ist dennoch davon auszugehen, dass die beobachteten Hautveränderungen zu einer Beeinflussung des Verhaltens der Tiere geführt haben.

Eine naheliegende Interpretation des fehlenden signifikanten Unterschiedes zwischen den Behandlungsgruppen in den übrigen Verhaltensanalysen ist, dass die Behandlung mit SAR145 drei Stunden nach Reperfusion nicht zu einer Verbesserung des funktionellen Endergebnisses bei einer Beobachtung über 28 Tage führt und die Ablehnung von H₁4 korrekt ist (Erklärungsmöglichkeit (2), S. 65). Ji et al. untersuchten 2009 die Wirkung des PPAR γ -Agonisten Pioglitazon auf die Infarktgröße nach drei Tagen und sechs Wochen, sowie auf das funktionelle Endergebnis sechs Wochen nach MCAo. Obwohl in der Untersuchung nach drei Tagen bei einer Behandlung mit Pioglitazon (Gabe direkt nach MCAo) signifikant kleinere Infarkte beobachtet werden konnten, zeigte sich bei der Untersuchung sechs Wochen nach MCAo weder in der Größe des Infarkts noch in den Verhaltensanalysen ein Unterschied zwischen der Verum- und der Vehikelgruppe.¹⁵⁰ Der fehlende Nachweis einer Neuroprotektion zu einem späteren Zeitpunkt spricht also nicht zwangsläufig gegen die vorhandene Neuroprotektion zu einem früheren Zeitpunkt. In der vorliegenden Arbeit konnten aufgrund des Gesundheitszustands der Tiere die ersten Verhaltensanalysen erst sieben Tage nach MCAo durchgeführt werden. Allerdings zeigte auch ein vier Tage nach MCAo durchgeführtes kraniales MRT keinen signifikanten Unterschied in den Infarktgrößen. Die Verumgruppe der für die Langzeitbeobachtung genutzten Kohorte zeigte sogar etwas größere Infarkte als die Vehikelgruppe. Wie bei den Knock-out-Tieren kann jedoch auch die in der Vehikelgruppe dieser Kohorte im Vergleich zur Verumgruppe erhöhte Mortalität zu einer Verzerrung der Ergebnisse und so durch die Selektion zu einer scheinbar geringeren mittleren Infarktgröße geführt haben. Die Aussagekraft der MRT-Befunde für die Interpretation der Ergebnisse der Verhaltenstests ist jedoch ohnehin nur begrenzt, da eine Korrelation der Infarktgröße mit den Ergebnissen der verwendeten Verhaltenstests unwahrscheinlich ist.^{201,202} Die fehlende Korrelation von

Infarktgröße und funktionellem Endergebnis stellt aber die Konstruktvalidität der verwendeten Tests in Frage, da beide als Operationalisierung des Konstrukts *Neuroprotektion* im Sinne der Konvergenzvalidität hoch korreliert sein müssten. Trotzdem konnten Ergebnisse bisheriger Arbeiten, die diese Tests für den Nachweis eines funktionellen Defizits bei Mäusen post-MCAo einsetzen, weitgehend repliziert werden. Im RotaRod konnte in guter Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Balkaya et al. ein motorisches Defizit nachgewiesen werden.¹⁶⁰ Dass dieser Effekt in der Verumgruppe über den gesamten Zeitraum persistierte, könnte mit den oben beschriebenen v.a. im CatWalk beobachteten Veränderungen der Haut zusammenhängen. Auch im Corner Test zeigte sich postoperativ eine eindeutige Lateralisierung in beiden Gruppen, die jedoch aufgrund der fehlenden präoperativen Werte nicht statistisch untersucht werden konnten. Im Pole Test wurde insbesondere in der subakuten Phase in beiden Gruppen eine signifikante Verlängerung von *T Turn* und *T Down* beobachtet. Dies passt zu den bisher veröffentlichten Ergebnissen, die eine Verlängerung von *T Turn* und *T Down* im Pole Test bis drei Wochen nach MCAo nachweisen konnten.¹⁶⁰ Es sei allerdings angemerkt, dass sich die vorliegende Arbeit in zwei wichtigen Punkten von einem Großteil der Vorarbeiten unterscheidet. Im Gegensatz zu diesen wurden alle Verhaltenstests der vorliegenden Arbeit randomisiert und verblindet durchgeführt und besitzen daher vermutlich eine höhere interne Validität. Es wurde jedoch keine *scheinoperierte* Kontrollgruppe verwendet, sondern mit Ausgangswerten verglichen, um die MCAo-Effekte darzustellen. Dies ist insbesondere problematisch bei Tests wie dem RotaRod, für die trotz präoperativen Trainings von einer weiteren Veränderung der Leistung durch Lernvorgänge auszugehen ist.¹⁶⁰ Grund für das Verzichten auf die *scheinoperierte* Kontrollgruppe war, dass nicht der Effekt der MCAo selbst, sondern mögliche Unterschiede zwischen der Verum- und der Vehikelgruppe untersucht werden sollten. Es ist jedoch fraglich, ob selbst bei Vorliegen eines substanziellen neuroprotektiven Effekts durch den direkten Vergleich der Behandlungsgruppen ein statistisch signifikanter Unterschied in den Verhaltenstests hätte gefunden werden können. Hetze et al. zeigten am Beispiel des CatWalks in einer Modellrechnung, dass selbst bei einer angenommenen Verbesserung um 50 % eine Gruppengröße von 30 Tieren pro Behandlungsgruppe nötig wäre, um einen signifikanten Behandlungseffekt bei einer statistischen Power von 0,8 zu zeigen.¹⁵⁹ Durch das Einbeziehen des Vergleichs mit präoperativen Werten kann die benötigte Gruppengröße auf 21 Tiere pro Behandlungsgruppe gesenkt werden. Selbst bei einer angenommenen Verbesserung von 70 % und Verwendung dieser Methode würden noch immer 12 Tiere pro Behandlungsgruppe benötigt.¹⁵⁹ Die Wahrscheinlichkeit, selbst einen angenommenen tatsächlichen Effekt von 30-50 % auf das funktionelle Endergebnis bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = .05$ nachzuweisen,

wäre somit unter der verwendeten Gruppengröße sowohl im Direktvergleich der Gruppen als auch im Vergleich mit einer *scheinoperierten* Kontrollgruppe nicht sehr wahrscheinlich gewesen.

Im verwendeten 45 min MCAo-Modell kommt es zu einem großen striatalen und einem ausgeprägten kortikalen Infarkt. Auch wenn die beobachtete Standardabweichung relativ hoch war, zeigten doch fast alle Tiere einen nahezu kompletten striatalen Infarkt. Unterschiede zeigten sich hauptsächlich im Ausmaß des kortikalen Schadens. Es ist daher fraglich, ob Verhaltenstests, wie der Pole Test oder der Corner Test, die sich für den Nachweis eines kortikalen Schadens als nicht nützlich erwiesen haben,^{164,165,173} überhaupt geeignet sind, einen Unterschied in diesem Bereich zu detektieren.

Auch wenn keine direkte Korrelation zwischen Infarktgröße und Ergebnissen der Verhaltensanalysen vorzuliegen scheint, so ist ausgehend von dem allenfalls mäßigen Effekt von SAR145 auf die Infarktgröße nicht mit einer Abbildung dieses Effekts in den angewendeten Verhaltenstests zu rechnen. Die Frage, ob Erklärungsmöglichkeit (2) oder (3) (S. 65) zutrifft lässt sich somit auch durch die Verhaltensanalysen nicht abschließend beantworten.

Trotz aller angesprochenen Probleme unterstreichen die vorliegenden Ergebnisse, wie wichtig die Untersuchung sowohl funktioneller als auch morphologischer Ergebnisparameter über einen längeren Beobachtungszeitraum ist. Dabei gilt es, auf eine für die erwarteten Effekte ausreichend große Gruppengröße zu achten, um einen Effektnachweis durch die bisher meist nur für die Unterscheidung zwischen *scheinoperierten*-Tieren und MCAo-Tieren validierten Tests zu ermöglichen. Gerade bei Verhaltensanalysen sollte zudem auf eine strikte Randomisierung und Verblindung Wert gelegt werden, um die interne Validität nicht zu gefährden. Die Verwendung einer *scheinoperierten* Kontrollgruppe ist zudem nötig, um MCAo spezifische (Behandlungs-)Effekte nachzuweisen.

4.1.5 Einfluss von SAR145 auf Marker der Inflammation

Wie bereits in Abschnitt 1.2.2 (S. 12) dargestellt, wird angenommen, dass die neuroprotektive Wirkung der Aktivierung des PPAR δ über eine Regulation der Inflammation vermittelt wird. Es sollte deshalb untersucht werden, ob die Behandlung mit SAR145 die NO-Produktion aktivierter Mikroglia und die ICAM-1-Expression aktivierter Endothelzellen zu reduzieren vermag. Sowohl die NO-Produktion durch aktivierte Mikroglia, als auch die gesteigerte ICAM-1-Expression auf Endothelzellen sollen an der postischämischen Gewebeschädigung beteiligt sein.^{57,142} Polak et al.¹⁴³ untersuchten 2005 die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten mit LPS und den Effekt

einer Behandlung mit einem selektiven PPAR δ -Agonisten (GW0742). Sie fanden mit den Daten der vorliegenden Arbeit vergleichbare Ergebnisse, nutzten jedoch eine andere statistische Auswertung. Eine analog zu der Arbeit von Polak et al. durchgeführte Analyse der vorliegenden Daten ergab nun auch für die niedrige Dosierung von SAR145 ein statistisch signifikantes Ergebnis (t-Test für unabhängige Stichproben, Griess DMSO vs. 10 μ M, $T = 2,769$, $p = .05$, MTT-Test DMSO vs. 10 μ M, $T = 1,320$, $p = .223$). Es handelt sich dabei allerdings um eine formal nicht zulässige Analyse. Zudem fällt auf, dass Polak et al. kein Maß für die Zellviabilität angeben. Somit ist nicht klar, ob die von ihnen beobachtete Reduktion der Aktivierung nicht auch auf Toxizität zurückzuführen sein könnte. Auch die Auswirkung einer Behandlung mit PPAR δ -Agonisten auf die Aktivierung von Endothelzellen wurde bereits in Vorarbeiten untersucht. Dabei fand man an *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) und *EAhy926 endothelial cells* (einer von HUVEC abgeleiteten Zelllinie) eine verminderte Expression von ICAM-1 und VCAM-1^{111,126,133,203} bei einer Stimulation in Anwesenheit von PPAR δ -Agonisten im Vergleich zu Vehikelkontrolle. Dies steht im Einklang mit der in dieser Arbeit beobachteten verminderten ICAM-1-Expression auf zerebralen Mausendothelzellen durch eine Behandlung mit SAR145. Keine der Vorarbeiten geht auf potentiell toxische Wirkungen der Agonisten ein, sodass kein Vergleich zu der hier beobachteten Toxizität bei hohen Dosierungen von SAR145 vorliegt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist insgesamt von einer mäßigen, die Aktivierung von Mikroglia und Endothelzellen hemmenden Wirkung der Behandlung mit SAR145 auszugehen. Bei Behandlung mit höheren Dosierungen lässt sich jedoch ein deutlicher zytotoxischer Effekt beobachten. Dies passt insgesamt gut zu den Ergebnissen der in-vivo-Versuche in der vorliegenden Studie.

4.1.6 Zusammenfassende Interpretation der eigenen Ergebnisse

Die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse gestaltet sich aus den oben genannten Gründen äußerst schwierig. Die Frage, ob eine Aktivierung des PPAR δ im untersuchten Zeitfenster überhaupt zu einer Neuroprotektion führt oder aber die verwendeten Methoden nur nicht in der Lage sind, eine - dann allerdings deutlich geringer als erwartet ausfallende - Neuroprotektion abzubilden, kann durch die durchgeführten Experimente nicht abschließend geklärt werden. Es ergibt sich aber dennoch ein konsistentes Bild einer mäßigen Neuroprotektion bei Behandlung in einer Dosierung von 10 mg/kg KG zum Zeitpunkt der Reperfusion. Bei Behandlung in höheren Dosierungen und zu einem späteren Zeitpunkt kommt es zu einem Verlust dieser Wirkung. Dies spiegelt sich auch in den in vitro Experimenten wieder, die eine Reduktion der Aktivierung von Mikroglia und Endothelzellen durch die Behandlung mit SAR145 und eine toxische Wirkung in

höheren Dosisbereichen zeigen. Eine Durchführung der *in vitro* Experimente an primären Zellkulturen aus PPAR δ -Knock-out-Tieren wäre eine Möglichkeit zur Abgrenzung des PPAR δ -spezifischen von einem allgemein toxischen Effekt.

Ohne jede Frage unterscheiden sich die vorliegenden Ergebnisse von Ergebnissen bisheriger Untersuchungen von PPAR δ -Agonisten im Schlaganfallmodell, die von einer deutlichen Neuroprotektion ausgehen. Ob dieser Unterschied auf einen Verlust der neuroprotektiven Wirkung von PPAR δ -Agonisten bei einer Behandlung nach MCAo im Gegensatz zu einer Vorbehandlung zurückzuführen ist oder andere Faktoren dazu beigetragen haben, hätte nur durch deutlich größere Gruppen und zusätzliche, analog zu den Vorarbeiten durchgeführte Versuche mit einer Vorbehandlung geklärt werden können.

4.2 Diskrepanz zu Ergebnissen bisher veröffentlichter Studien

Neben den bereits diskutierten Erklärungen ist zudem möglich, dass Unterschiede in der Methodik zwischen der eigenen und bisher durchgeführten Studien, sowie der „Studienqualität“ (bewertet nach den CAMARADES Kriterien s.u.) zu einer künstlichen Vergrößerung der Effektgröße in vorherigen Studien und damit zur Diskrepanz zur vorliegenden Arbeit geführt haben könnten.

4.2.1 Systematische Recherche und Bewertung der Studienqualität bisher publizierter Arbeiten

Um eine Übersicht über alle bisher durchgeführten Studien zu erhalten wurde eine systematische Suche mit dem Suchbegriff: (*stroke OR ischemi* OR ischaemi* OR cerebrovascular OR "middle cerebral artery" OR MCA OR MCAO OR ACA OR ACAO OR "anterior cerebral artery"*) AND (*PPAR OR "PPAR delta"[Mesh] OR "ppar beta" OR "Peroxisome proliferator activated receptor" OR "GW0742" OR "GW501516" OR "16504"*) bei *Pubmed* durchgeführt. Die Titel und Zusammenfassungen der Ergebnisse wurden durchgesehen und alle Studien ausgewählt, die den Effekt eines spezifischen PPAR δ -Agonisten in einem Tiermodell des Schlaganfalls untersuchten. Allgemeine Informationen der Studie (Autor, Jahr, Journal etc.), sowie das Studiendesign, Qualitätsparameter und die Ergebnisse im Sinne eines Einflusses auf die Infarktgröße und das funktionelle Endergebnis wurden extrahiert. Als Qualitätsparameter diente

Diskussion

der von Macleod et al. vorgeschlagene 10 Punkte-Score, bei dem jeweils ein Punkt für die Erfüllung der folgenden Kriterien vergeben wird:

1. Publikation in einem *peer-reviewed journal*
2. Kontrolle der Temperatur
3. Verwendung von Tieren mit Komorbiditäten
4. Vermeidung von Anästhetika mit intrinsischem neuroprotektivem Potential
5. Angabe einer Berechnung der benötigten Gruppengröße
6. Randomisierte Zuordnung zu einer Behandlungsgruppe
7. Verblindung des Operateurs für die Zugehörigkeit der Tiere zu einer Behandlungsgruppe
8. Verblindete Auswertung der Ergebnisparameter
9. Durchführung in Übereinstimmung mit geltenden Tierschutzbestimmungen
10. Nennung möglicher Interessenskonflikte.²⁰⁴

Die Suche ergab 540 Ergebnisse (durchgeführt am 23.04.2015). Davon untersuchten lediglich drei Studien den Einfluss eines selektiven PPAR δ -Agonisten auf das Endergebnis in einem Tiermodell des Schlaganfalls. Diese Studien hatten insgesamt eine geringe Studienqualität (siehe Tab. 4.1, S. 79).

Tab. 4.1: Übersicht über bisherige Studien zu PPAR δ -Agonisten in Schlaganfallmodellen

Erstautor	Jahr	Spezies	Gesamt Tierzahl	Ligand	Qualität	Verblind. Durchführung	Verblind. Outcome	Random.	Behandlungszeitpunkt	Ergebnis
Chao, Xiaodong	2014	Spague-Dawley Ratten	16	GW0742	5	-	✓	-	30 min vor MCAo	-44 %, Infarktgröße im Vergleich zu Vehikel
Yin, Ke-Jie	2010	C57BL/6 Mäuse	12	GW501516	3	-	-	-	24 h vor MCAo	-41 %
Iwashita, Akinori	2006	Wistar Ratten	nicht angegeben	L-165041 GW501516	3	-	-	-	24 h vor MCAo	-18 % bzw. -36 %

Nur in einer der drei Studien wurden die Daten verblindet für die Gruppenzugehörigkeit der Tiere erhoben. In keiner Studie wurde über eine Berechnung der benötigten Gruppengröße, randomisierte Durchführung der Versuche oder eine Verblindung des Durchführenden berichtet. Auch wurde in keiner der Arbeiten angegeben, ob und wie viele Tiere aus der Analyse der Daten ausgeschlossen wurden. Es wurde weder eine Dosis-Wirkungs-Kurve, noch eine Untersuchung des Zeitfensters für eine wirksame Behandlung durchgeführt, wie in den STAIR-Richtlinien empfohlen. Alle Studien untersuchten eine Behandlung vor Induktion der Ischämie. Die Tötung

der Tiere und Bestimmung der Infarktgröße erfolgte in den drei Studien zu einem frühen Zeitpunkt, d. h. 24 h nach MCAo. Die einzige Studie, die den Einfluss auf das funktionelle Endergebnis betrachtete, nutzte lediglich den oben genannten und für diesen Zweck nicht validierten 5-Punkte-Score nach Longa.¹⁵² Die Analyse dieser kategorialen Daten erfolgte mittels ANOVA, die nur für kontinuierliche Variablen zulässig ist. Der für die Gruppenvergleiche verwendete Post-hoc-Test ist nicht angegeben. Alle Studien berichteten eine signifikante Reduktion der Infarktgröße durch die Behandlung mit einem PPAR δ -Agonisten. Diese schwankte jedoch zwischen 18 % und 44 %. Bei den drei Studien handelt es sich um kleine Studien mit 6-8 Tieren pro Behandlungsgruppe und nur einer einzigen Vehikelgruppe. Was könnte also zu den unterschiedlichen Ergebnissen der Vorarbeiten im Vergleich zur vorliegenden Studie geführt haben?

4.2.2 Einfluss der Studienqualität auf Effektgröße und Replizierbarkeit

O'Collins et al. testeten im Jahr 2011 eine durch systematische Metaanalyse gefundene Kombination dreier Substanzen (Magnesiumsulfat, Melatonin und Minocyclin), die alle in Vorarbeiten eine substanzielle Reduktion der Infarktgröße bewirkt hatten (respektive 25 %, 40 %, 30 %). Obwohl die Metaanalyse insgesamt 102 Experimente zu den untersuchten Substanzen umfasste, konnten O'Collins et al. die publizierten Daten unter an die STAIR-Richtlinien angepassten Bedingungen nicht replizieren und fanden keinen Unterschied zwischen der Verum- und der Vehikelgruppe. Wie auch im vorliegenden Fall war die Studienqualität der Vorarbeiten insgesamt gering und es gab keine Arbeit, in der die Versuche und die Analyse des Endergebnisses verblindet und randomisiert durchgeführt worden wären.²⁰⁵ Macleod et al. zeigten in systematischen Metaanalysen der potentiellen Neuroprotektiva FK506 und NXY-059, dass Studien mit einer geringeren Studienqualität über höhere Effektgrößen berichten.^{192,193} Die Analyse der Arbeiten zu dem in klinischen Studien gescheiterten Neuroprotektivum NXY-059 zeigte, dass die Reduktion der Infarktgröße in Studien, in denen die Tiere randomisierten wurden nur 20 % betrug im Gegensatz zu 52 % in Studien ohne randomisierte Zuordnung. Ähnliches zeigt sich auch in Metaanalysen zu anderen Interventionen.²⁰⁴

4.2.2.1 Der Positive Prädiktive Wert und mögliche Einflussfaktoren

Eine unterschiedlich strenge Befolgung der Richtlinien zur Sicherung der Studienqualität und zur Vermeidung von *Bias* könnte also auch im vorliegenden Fall zu einem Unterschied in den Ergebnissen geführt haben. Probleme bei der Replizierbarkeit wissenschaftlicher Studien

beschränken sich jedoch keineswegs auf Schlaganfallmodelle. Zwei Studien zur Replizierbarkeit biomedizinischer Arbeiten berichten von Replikationsraten von 11 und 25 %.^{206,207} Dabei war weder die Qualität des Journals, in dem Vorarbeiten veröffentlicht waren, noch die Anzahl der Vorarbeiten ein Prädiktor für die Replizierbarkeit. Es wurden verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für diese Ergebnisse vorgeschlagen, die sich in Faktoren, die auf verschiedene Arten von *Bias* zurückzuführen sind, und von *Bias* unabhängige, durch die verwendete statistische Methode bedingte Faktoren unterteilen lassen. Beide Arten fließen in das von Ioannidis vorgeschlagene Modell zur Berechnung des *Positiven Prädiktiven Werts* (PPV) einer Studie ein.²⁰⁸ Der PPV beschreibt die Aussagekraft einer Studie und damit auch ein Maß ihrer Replizierbarkeit.

Power

Ein entscheidender Faktor für den PPV ist die jeweilige Power. Nach der von Ioannidis aufgestellten Formel zur Berechnung des PPV ergibt sich dieser aus dem erreichten α -Level, der „Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Hypothese vor dem Durchführen der Studie“ (R) und der Power der Studie.²⁰⁸ Da im Allgemeinen ein α -Level von $> .05$ als Grenzwert für statistische Signifikanz gesetzt wird und R für eine gegebene Hypothese nicht zu beeinflussen ist, ist die Power der entscheidende Wert für die Berechnung des PPVs und damit letztendlich der Aussagekraft einer Studie.²⁰⁹ Die durchschnittliche Power in neurowissenschaftlichen Studien liegt jedoch lediglich bei 8-31 %.²⁰⁹ Eine Analyse der drei Arbeiten zu PPAR δ -Agonisten in Tiermodellen des Schlaganfalls ergab eine Power zwischen 20 und 99 %. Ist die von Button et al.²⁰⁹ beschriebene Problematik von Studien mit geringer Power für den vorliegenden Fall also gar nicht relevant?

Das Proteus Phänomen und *regression to the mean*

Es gilt zu beachten, dass lediglich drei Studien mit kleinen Gruppengrößen zur Wirkung von PPAR δ -Agonisten auf die Schlaganfallgröße vorliegen. Durch die Verwendung kleiner Gruppengrößen erreichen nur Studien, die zufällig einen Effekt am oberen Ende der normalverteilten Streuung um die tatsächliche Effektgröße finden, das geforderte statistische Signifikanzkriterium von $p < .05$. Dieser als "*winners curse*" oder Proteus-Phänomen bekannte Effekt beschreibt die Beobachtung, dass die ersten Studien in einem neuen Feld meist Extremwerte berichten und sich erst bei einer größeren Anzahl von Studien der im Mittel gefundene Effekt der wahren Effektgröße annähert (*regression to the mean*). Eine nachträglich durchgeführte Poweranalyse, die die gefundene Effektgröße als die „wahre“ Effektgröße

annimmt, überschätzt daher zwangsläufig die Power der Studie und hat daher keine Aussagekraft. Eine Möglichkeit, dennoch die „wahre Effektgröße“ und damit die Power im Nachhinein abzuschätzen, ergibt sich aus der Durchführung systematischer Metaanalysen, vorausgesetzt, es liegt eine ausreichende Anzahl an Arbeiten vor. Sena et al.²¹⁰ konnten zeigen, dass die Effektgröße für die Untersuchung von tPA in Tiermodellen des Schlaganfalls erst nach ungefähr 1500 in die Metaanalyse eingeschlossenen Tieren stabil war.

Publikation Bias

Die Genauigkeit, mit der Metaanalysen die wahre Effektgröße abzuschätzen vermögen, wird allerdings erheblich dadurch gemindert, dass nicht alle durchgeführten Studien auch publiziert werden und daher auch nicht alle erhobenen Effektgrößen Eingang in Metaanalysen finden. Dies hat insgesamt eine Überschätzung der durch Metaanalysen bestimmten Effektgrößen zur Folge. So schätzen Sena et al.²¹⁰ mithilfe mathematischer Modelle (Funnel Plots, Egger Regression und *trim-and-fill* Plots), dass in systematischen Übersichtsarbeiten zu Schlaganfallstudien im Tiermodell bis zu einem Drittel der berichteten Effektgröße alleine auf den sogenannten *publication bias* zurückzuführen ist, der eine selektive Veröffentlichung von Studien mit statistisch signifikanten Ergebnissen beschreibt. Es liegen jedoch zu wenige Vorarbeiten vor, um anhand einer Metaanalyse eine Aussage über diese Effekte in den Untersuchungen zu PPAR δ -Agonisten im Schlaganfallmodell zuzulassen.

Zusammenfassend machen die methodischen Mängel der Vorarbeiten, aber auch die kleinen Gruppengrößen in der vorliegenden Arbeit eine Interpretation der Rolle von PPAR δ -Agonisten im Schlaganfall schwierig. Ausgehend von der vorliegenden Studie sollte eine deutlich geringere als die bisher publizierte Effektgröße angenommen werden. Eine Reevaluierung sollte daher nur mit für diese Effektgröße ausreichend großen Gruppen und unter Wahrung aller Qualitätsstandards durchgeführt werden. Auch scheint eine genauere Betrachtung der in den Verhaltensstudien beobachteten „Nebenwirkung“, die das translationale Potential mindern würde, vor einer weiteren Untersuchung in Schlaganfallmodellen sinnvoll. Im Folgenden sollen daher Maßnahmen diskutiert werden, die das Problem der mangelnden Aussagekraft bisheriger Studien adressieren.

4.3 Hindernisse in der translationalen Forschung

Charles R. Darwin wird aus „*The Descent of Man*“ häufig mit dem Satz zitiert: „*In the long history of humankind (and animal kind, too) those who learned to collaborate and improvise*

most effectively have prevailed.“ (Anzahl der Google-Suchergebnisse für das volle Zitat: ca. 4020 am 30.04.2015) Häufig wird dieses Zitat im Zusammenhang mit Forderungen nach Qualitätsverbesserungen und verbesserter Zusammenarbeit in der Wissenschaft verwendet.²¹¹ Bisher fehlende Zusammenarbeit (z. B. im Sinne multizentrischer präklinischer Studien) und falscher Selektionsdruck wurden dabei mehrfach als mögliche Gründen für den geringen translationalen Erfolg und die schlechte Replizierbarkeit präklinischer Studien genannt.^{212,213} Geht man davon aus, dass die fehlende Translation präklinischer Studien tatsächlich nicht auf biologische Differenzen zwischen den Modellen und der menschlichen Biologie zurückzuführen ist,²¹⁴ muss von einer Blockade durch methodische Probleme an einer oder mehreren Stellen der translationalen Kaskade ausgegangen werden.

4.3.1 Die translationale Kaskade

Diese Kaskade umfasst dabei idealerweise mehrere Stufen von der Identifizierung der Zielstruktur und eines möglichen Wirkmechanismus über in vitro und in-vivo-Experimente bis hin zur Testung in klinischen Studien. Die Überschätzung der Effektgröße in präklinischen Studien^{192,193,209,215} und folgenden klinische Studien, die zu klein sind, um den tatsächlichen Effekt nachzuweisen, sowie Unterschiede in der Intervention (z. B. im Behandlungszeitpunkt) könnte im letzten Schritt des translationalen Prozess zum Versagen geführt haben.²¹⁴

Größere präklinische Studien könnten einen realistischeren Schätzwert der tatsächlichen Effektgröße als Grundlage für die Planung klinischer Studien liefern. Zudem hängt der PPV einer Studie und auch die Anzahl falsch positiver Studien maßgeblich mit der Power zusammen, sodass eine höhere Power präklinischer Arbeiten die Anzahl der auf Basis falsch positiver Vorergebnisse durchgeführten Folgestudien senken könnte. Doch auch bei ausreichender Power kann *Bias* zu einer Verzerrung der Ergebnisse und damit zu falsch positiven Studien führen. Durch Randomisierung, Verblindung und Einhaltung vordefinierter Ein- und Ausschlusskriterien kann *Bias* minimiert und die interne Validität gesteigert werden. Um die externe Validität präklinischer Studien zu erhöhen, sollte zudem auf Bedingungen geachtet werden, die der klinischen Situation ähnlicher sind. Dazu gehört nicht nur eine Untersuchung von für die Klinik relevanten Behandlungszeitpunkten und Ergebnisparametern, sondern auch die Verwendung von gealterten Tieren beider Geschlechter. Im Jahr 2012 entwarfen Howells et al. ein Modell zur Steigerung der Effizienz der Medikamentenentwicklung für die Behandlung des Schlaganfalls.²¹⁶ Wichtiger Bestandteil dieses Modells ist die Durchführung großer internationaler multizentrischer Tierstudien, wie auch von Bath et al.²¹⁷ und Dirnagl und Fischer²¹² gefordert wurde. Diese in ihrem Design an multizentrische klinische Studien angelehnten Untersuchungen

Diskussion

könnten durch große Fallzahlen, hohe Qualitätsstandards und der Möglichkeit zur Stratifizierung (z. B. verschiedene Spezies, Geschlechter und Komorbiditäten) die Aussagekraft der präklinischen Daten erhöhen und somit die Durchführung teurer und ethisch bedenklicher klinischer Studien mit sich letztendlich als unwirksam herausstellenden Medikamenten verhindern. Die Multi-PART Initiative hat sich nun zum Ziel gesetzt eine Plattform zur Durchführung solcher multizentrischen präklinischen Studien zu entwickeln (www.multi-part.org) und eine kürzlich erschienene erste solche Studie belegt deren Durchführbarkeit.²¹⁸

Durch ein früheres Aussieben unwirksamer Interventionen könnten so Ressourcen besser genutzt und eine erfolgreiche Translation wahrscheinlicher gemacht werden. Viele der hier vorgestellten Vorschläge, wie z. B. die STAIR-Richtlinien existieren seit über 15 Jahren, werden jedoch nur schleppend umgesetzt.²¹⁹ Es wird angenommen, dass dies unter anderem mit Anreizen in der Wissenschaftskultur zusammenhängen könnte, deren Hauptwährung die Anzahl der Zitationen und Impactpunkte darstellt²¹³ und bei der Replizierbarkeit und Studienqualität nicht im Vordergrund stehen. Dass die Anzahl der Zitationen nicht immer mit der Verlässlichkeit der Information zusammenhängt, spiegelt sich auch in dem oben genannten „Darwin-Zitat“ wieder. Laut einer Forschungsgruppe der Universität Cambridge lässt sich dieses wahrscheinlich nicht, oder zumindest nicht schriftlich nachweislich, Darwin zuschreiben.²²⁰

Auch wenn keine schnelle Lösung dieser Problematik zu erwarten ist, hat das Bewusstsein für das Problem und auch die Anzahl vorgeschlagener Lösungsansätze stark zugenommen. Anhand verschiedener Beispiele der letzten Jahre und Jahrzehnte zeigten Dirnagl und Endres 2014, dass eine Translation präklinisch gewonnener Erkenntnisse in die klinische Praxis möglich ist und einen starken Einfluss auf das Leben individueller Patienten und die Gesellschaft als Ganzes haben können.²¹⁴ Die für eine erfolgreiche Translation nötigen Methoden und das Wissen um deren korrekte Anwendung existieren also, sie müssten nur häufiger Anwendung finden.

Literaturverzeichnis

1. Haustein T, Mischke J. *Ältere Menschen in Deutschland Und Der EU*. Im Blickpunkt; 2011. doi:10.1111/jgs.12989/full.
2. Bundesamt S. *Bevölkerung Deutschlands Bis 2060. 12. Koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung*. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt; 2009.
3. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, Moran AE, Sacco RL, Anderson L, Truelsen T, O'Donnell M, Venketasubramanian N, Barker-Collo S, Lawes CMM, Wang W, Shinohara Y, Witt E, Ezzati M, Naghavi M, Murray C, Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2010 (GBD 2010) and the GBD Stroke Experts Group. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2014;383(9913):245-254.
4. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, de Ferranti S, Després J-P, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Willey JZ, Woo D, Yeh RW, Turner MB, American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015;131(4):e29-e322. doi:10.1161/CIR.0000000000000152.
5. Krishnamurthi RV, Feigin VL, Forouzanfar MH, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, Moran AE, Sacco RL, Anderson LM, Truelsen T, O'Donnell M, Venketasubramanian N, Barker-Collo S, Lawes CMM, Wang W, Shinohara Y, Witt E, Ezzati M, Naghavi M, Murray C, Global Burden of Diseases, Injuries, Risk Factors Study 2010 (GBD 2010), GBD Stroke Experts Group. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Glob Health*. 2013;1(5):e259-e281. doi:10.1016/S2214-109X(13)70089-5.
6. Howard G, Goff DC. Population shifts and the future of stroke: forecasts of the future burden of stroke. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1268(1):14-20. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06665.x.
7. Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P, Rayner M. *European Cardiovascular Disease Statistics 2012*. (Logstrup S, O'Kelly S, eds.). Brussels, Sophia Antipolis: European Heart Network, European Society of Cardiology; 2012.
8. Cole W. A physico-medical essay concerning the late frequency of apoplexies together with a general method of their prevention and cure : in a letter to a physician. *The Theater*. 1869:1-57.
9. Baron JC. Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc Dis*. 2001;11 Suppl 1:2-8.

Literaturverzeichnis

10. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22(9):391-397. doi:10.1016/S0166-2236(99)01401-0.
11. Endres M, Dirnagl U, Moskowitz MA. The ischemic cascade and mediators of ischemic injury. *Handb Clin Neurol.* 2009;92:31-41. doi:10.1016/S0072-9752(08)01902-7.
12. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke.* 1981;12(6):723-725.
13. Ginsberg MD, Belayev L, Zhao W, Huh PW, Busto R. The acute ischemic penumbra: topography, life span, and therapeutic response. *Acta Neurochir Suppl.* 1999;73:45-50.
14. Wardlaw JM, Murray V, Berge E, Del Zoppo GJ. Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(4):CD000213. doi:10.1002/14651858.CD000213.pub2.
15. Hacke W, Furlan AJ, Al-Rawi Y, Dávalos A, Fiebach JB, Gruber F, Kaste M, Lipka LJ, Pedraza S, Ringleb PA, Rowley HA, Schneider D, Schwamm LH, Leal JS, Söhngen M, Teal PA, Wilhelm-Ogunbiyi K, Wintermark M, Warach S. Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurol.* 2009;8(2):141-150. doi:10.1016/S1474-4422(08)70267-9.
16. Parsons M, Spratt N, Bivard A, Campbell B, Chung K, Miteff F, O'Brien B, Bladin C, McElduff P, Allen C, Bateman G, Donnan G, Davis S, Levi C. A randomized trial of tenecteplase versus alteplase for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2012;366(12):1099-1107. doi:10.1056/NEJMoa1109842.
17. Kummer von R, Albers GW, Mori E, DIAS Steering Committees. The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke (DIAS) clinical trial program. *Int J Stroke.* 2012;7(7):589-596. doi:10.1111/j.1747-4949.2012.00910.x.
18. Genentech, Inc. Full Prescribing Information for Activase. http://www.gene.com/download/pdf/activase_prescribing.pdf. Published 1987. Accessed July 20, 2015.
19. European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee, ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25(5):457-507. doi:10.1159/000131083.
20. Katzan IL, Furlan AJ, Lloyd LE, Frank JI, Harper DL, Hinchey JA, Hammel JP, Qu A, Sila CA. Use of Tissue-Type Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke: The Cleveland Area Experience. *Jama.* 2000;283(9):1151-1158. doi:10.1001/jama.283.9.1151.
21. García-Moncó JC, Pinedo A, Escalza I, Ferreira E, Foncea N, Gómez-Beldarrain M, Ruiz-Ojeda J, Mateo I, Mediavilla J, Basterretxea JM. Analysis of the reasons for exclusion from tPA therapy after early arrival in acute stroke patients. *Clin Neurol*

- Neurosurg.* 2007;109(1):50-53. doi:10.1016/j.clineuro.2006.06.006.
22. Barber PA, Zhang J, Demchuk AM, Hill MD, Buchan AM. Why are stroke patients excluded from TPA therapy? An analysis of patient eligibility. *Neurology.* 2001;56(8):1015-1020. doi:10.1212/WNL.56.8.1015.
 23. Fonarow GC, Smith EE, Saver JL, Reeves MJ, Bhatt DL, Grau-Sepulveda MV, Olson DM, Hernandez AF, Peterson ED, Schwamm LH. Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke: patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes. *Circulation.* 2011;123(7):750-758. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.974675.
 24. Lees KR, Bluhmki E, Kummer von R, Brott TG, Toni D, Grotta JC, Albers GW, Kaste M, Marler JR, Hamilton SA, Tilley BC, Davis SM, Donnan GA, Hacke W, ECASS, ATLANTIS, NINDS and EPITHET rt-PA Study Group, Allen K, Mau J, Meier D, del Zoppo G, De Silva DA, Butcher KS, Parsons MW, Barber PA, Levi C, Bladin C, Byrnes G. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet.* 2010;375(9727):1695-1703. doi:10.1016/S0140-6736(10)60491-6.
 25. Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, Schonewille WJ, Vos JA, Nederkoorn PJ, Wermer MJH, van Walderveen MAA, Staals J, Hofmeijer J, van Oostayen JA, Lycklama à Nijeholt GJ, Boiten J, Brouwer PA, Emmer BJ, de Bruijn SF, van Dijk LC, Kappelle LJ, Lo RH, van Dijk EJ, de Vries J, de Kort PLM, van Rooij WJJ, van den Berg JSP, van Hasselt BAAM, Aerden LAM, Dallinga RJ, Visser MC, Bot JCJ, Vroomen PC, Eshghi O, Schreuder THCML, Heijboer RJJ, Keizer K, Tielbeek AV, Hertog den HM, Gerrits DG, van den Berg-Vos RM, Karas GB, Steyerberg EW, Flach HZ, Marquering HA, Sprengers MES, Jenniskens SFM, Beenen LFM, van den Berg R, Koudstaal PJ, van Zwam WH, Roos YBWEM, van der Lugt A, van Oostenbrugge RJ, Majoie CBLM, Dippel DWJ, MR CLEAN Investigators. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015;372(1):11-20. doi:10.1056/NEJMoa1411587.
 26. Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, Roy D, Jovin TG, Willinsky RA, Sapkota BL, Dowlatshahi D, Frei DF, Kamal NR, Montanera WJ, Poppe AY, Ryckborst KJ, Silver FL, Shuaib A, Tampieri D, Williams D, Bang OY, Baxter BW, Burns PA, Choe H, Heo J-H, Holmstedt CA, Jankowitz B, Kelly M, Linares G, Mandzia JL, Shankar J, Sohn S-I, Swartz RH, Barber PA, Coutts SB, Smith EE, Morrish WF, Weill A, Subramaniam S, Mitha AP, Wong JH, Lowerison MW, Sajobi TT, Hill MD, ESCAPE Trial Investigators. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015;372(11):1019-1030. doi:10.1056/NEJMoa1414905.
 27. Campbell BCV, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, Yan B, Dowling RJ, Parsons MW, Oxley TJ, Wu TY, Brooks M, Simpson MA, Miteff F, Levi CR, Krause M, Harrington TJ, Faulder KC, Steinfort BS, Priglinger M, Ang T, Scroop R, Barber PA, McGuinness B, Wijeratne T, Phan TG, Chong W, Chandra RV, Bladin CF, Badve M, Rice H, de Villiers L, Ma H, Desmond PM, Donnan GA, Davis SM, EXTEND-IA Investigators. Endovascular therapy for ischemic stroke

Literaturverzeichnis

- with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med.* 2015;372(11):1009-1018. doi:10.1056/NEJMoa1414792.
28. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener H-C, Levy EI, Pereira VM, Albers GW, Cognard C, Cohen DJ, Hacke W, Jansen O, Jovin TG, Mattle HP, Nogueira RG, Siddiqui AH, Yavagal DR, Baxter BW, Devlin TG, Lopes DK, Reddy VK, de Rochemont RDM, Singer OC, Jahan R, Investigators SP. Stent-Retriever Thrombectomy after Intravenous t-PA vs. t-PA Alone in Stroke. *N Engl J Med.* 2015;372(24):2285-2295. doi:10.1056/NEJMoa1415061.
 29. Zhu HF, Newcommon NN, Cooper ME, Green TL, Seal B, Klein G, Weir NU, Coutts SB, Watson T, Barber PA, Demchuk AM, Hill MD, Calgary Stroke Program. Impact of a stroke unit on length of hospital stay and in-hospital case fatality. *Stroke.* 2009;40(1):18-23. doi:10.1161/STROKEAHA.108.527606.
 30. Stroke Unit Trialists' Collaboration. Collaborative systematic review of the randomised trials of organised inpatient (stroke unit) care after stroke. *Brit Med J.* 1997;314(7088):1151-1151. doi:10.1136/bmj.314.7088.1151.
 31. Rothwell PM, Algra A, Amarenco P. Medical treatment in acute and long-term secondary prevention after transient ischaemic attack and ischaemic stroke. *Lancet.* 2011;377(9778):1681-1692. doi:10.1016/S0140-6736(11)60516-3.
 32. Pan F, Hernandez L, Ward A. Cost-effectiveness of stroke treatments and secondary preventions. *Expert Opin Pharmaco.* 2012;13(12):1751-1760. doi:10.1517/14656566.2012.699522.
 33. Jauch EC, Saver JL, Adams HP, Bruno A, Connors JJB, Demaerschalk BM, Khatri P, McMullan PW, Qureshi AI, Rosenfield K, Scott PA, Summers DR, Wang DZ, Wintermark M, Yonas H, American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Peripheral Vascular Disease, Council on Clinical Cardiology. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2013;44(3):870-947. doi:10.1161/STR.0b013e318284056a.
 34. Kikuchi K, Tancharoen S, Takeshige N, Yoshitomi M, Morioka M, Murai Y, Tanaka E. The efficacy of edaravone (radicut), a free radical scavenger, for cardiovascular disease. *Int J Mol Sci.* 2013;14(7):13909-13930. doi:10.3390/ijms140713909.
 35. Edaravone Acute Infarction Study Group. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis.* 2003;15(3):222-229.
 36. Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener H-C, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U. NXY-059 for the Treatment of Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med.* 2007;357(6):562-571. doi:10.1056/NEJMoa070240.
 37. O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol.* 2006;59(3):467-477. doi:10.1002/ana.20741.

Literaturverzeichnis

38. Endres M, Engelhardt B, Koistinaho J, Lindvall O, Meairs S, Mohr JP, Planas A, Rothwell N, Schwaninger M, Schwab ME, Vivien D, Wieloch T, Dirnagl U. Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25(3):268-278. doi:10.1159/000118039.
39. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron.* 2010;67(2):181-198. doi:10.1016/j.neuron.2010.07.002.
40. del Zoppo GJ. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 2009;158(3):972-982. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.08.028.
41. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 2003;26(5):248-254. doi:10.1016/S0166-2236(03)00071-7.
42. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.* 2000;179(S 1-2):1-33. doi:doi:10.1016/S0022-510X(00)00386-5.
43. Mies G, Iijima T, Hossmann KA. Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport.* 1993;4(6):709-711. doi:10.1097/00001756-199306000-00027.
44. Nedergaard M, Hansen AJ. Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *J Cerebr Blood F Met.* 1993;13(4):568-574. doi:10.1038/jcbfm.1993.74.
45. Busch E, Gyngell ML, Eis M, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA. Potassium-induced cortical spreading depressions during focal cerebral ischemia in rats: contribution to lesion growth assessed by diffusion-weighted NMR and biochemical imaging. *J Cerebr Blood F Met.* 1996;16(6):1090-1099. doi:10.1097/00004647-199611000-00002.
46. Windmüller O, Lindauer U, Foddiss M, Einhäupl KM, Dirnagl U, Heinemann U, Dreier JP. Ion changes in spreading ischaemia induce rat middle cerebral artery constriction in the absence of NO. *Brain.* 2005;128(Pt 9):2042-2051. doi:10.1093/brain/awh545.
47. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med.* 2011;17(4):439-447. doi:10.1038/nm.2333.
48. Puisieux F, Deplanque D, Pu Q, Souil E, Bastide M, Bordet R. Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *Eur J Pharmacol.* 2000;389(1):71-78. doi:10.1016/S0014-2999(99)00893-6.
49. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med.* 2011;17(7):796-808. doi:10.1038/nm.2399.

Literaturverzeichnis

50. Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, Schenkel J, Herdegen T, Debatin KM. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci.* 1999;19(10):3809-3817.
51. Janoff A. Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock; effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. *Int Anesthesiol Clin.* 1964;2(2):251.
52. Nguyen AQ, Cherry BH, Scott GF, Ryou M-G, Mallet RT. Erythropoietin: powerful protection of ischemic and post-ischemic brain. *Exp Biol Med.* 2014;239(11):1461-1475. doi:10.1177/1535370214523703.
53. Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, Meisel A. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci.* 2002;22(23):10291-10301.
54. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck H-H, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, R  ther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sir  n A-L. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med.* 2002;8(8):495-505.
55. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegrzyn M, J  hnig P, Herrmann M, Knauth M, B  hr M, Heide W, Wagner A, Schwab S, Reichmann H, Schwendemann G, Dengler R, Kastrup A, Bartels C, EPO Stroke Trial Group. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke.* 2009;40(12):e647-e656. doi:10.1161/STROKEAHA.109.564872.
56. Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. Role of Inflammation and Its Mediators in Acute Ischemic Stroke. *J Cardiovasc Trans Res.* September 2013:1-18. doi:10.1007/s12265-013-9508-6.
57. Zhang RL, Chopp M, Li Y, Zaloga C, Jiang N, Jones ML, Miyasaka M, Ward PA. Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology.* 1994;44(9):1747-1751.
58. Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ. Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J Neurosci.* 2001;21(15):5528-5534.
59. Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke Results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. *Neurology.* 2001;57(8):1428-1434. doi:10.1212/WNL.57.8.1428.
60. Emsley HCA, Smith CJ, Georgiou RF, Vail A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ, Acute Stroke Investigators. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 2005;76(10):1366-1372. doi:10.1136/jnnp.2004.054882.
61. Thorp JM, Waring WS. Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate. *Nat Neurosci.* 1962;194:948-949.

doi:10.1038/194948a0.

62. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nat Neurosci.* 1990;347(6294):645-650. doi:10.1038/347645a0.
63. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* 1992;68(5):879-887.
64. Schmidt A, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Shinar D, Rodan GA. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol.* 1992;6(10):1634-1641. doi:10.1210/mend.6.10.1333051.
65. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(15):7355-7359.
66. Braissant O, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology.* 1998;139(6):2748-2754. doi:10.1210/endo.139.6.6049.
67. Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience.* 2004;123(1):131-145.
68. Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* 2000;129(5):823-834. doi:10.1038/sj.bjp.0703149.
69. Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2006;110(3):371-385. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.08.007.
70. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science.* 2001;294(5548):1866-1870. doi:10.1126/science.294.5548.1866.
71. Krey G, Keller H, Mahfoudi A, Medin J, Ozato K, Dreyer C, Wahli W. Xenopus peroxisome proliferator activated receptors: genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. *J Steroid Biochem.* 1993;47(1-6):65-73.
72. Kota BP, Huang T, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Rec.* 2005.
73. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999;20(5):649-688. doi:10.1210/edrv.20.5.0380.
74. IJpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X

Literaturverzeichnis

- receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem.* 1997;272(32):20108-20117.
75. Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9(2):140-147. doi:10.1016/S0959-437X(99)80021-5.
76. Bugge A, Mandrup S. Molecular Mechanisms and Genome-Wide Aspects of PPAR Subtype Specific Transactivation. *PPAR Res.* 2010;2010(11):1-12. doi:10.1155/2010/169506.
77. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res.* 2006;45(2):120-159. doi:10.1016/j.plipres.2005.12.002.
78. Bishop-Bailey D, Wray J. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2003;71(1-2):1-22.
79. Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(6):2160-2164.
80. Bordet R, Ouk T, Petrault O, Gelé P, Gautier S, Laprais M, Deplanque D, Duriez P, Staels B, Fruchart J-C, Bastide M. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt 6):1341-1346. doi:10.1042/BST0341341.
81. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CNA, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):726-741. doi:10.1124/pr.58.4.5.
82. Heneka MT, Landreth GE, Hüll M. Drug insight: effects mediated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in CNS disorders. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007;3(9):496-504. doi:10.1038/ncpneuro0586.
83. Kapadia R, Yi J-H, Vemuganti R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front Biosci.* 2008;13:1813-1826.
84. Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, Muscat GEO. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol.* 2003;17(12):2477-2493. doi:10.1210/me.2003-0151.
85. Lee C-H, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong L-W, Olefsky JM, Gonzalez FJ, Ham J, Kang H, Peters JM, Evans RM. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(9):3444-3449.

Literaturverzeichnis

doi:10.1073/pnas.0511253103.

86. Sprecher DL. Lipids, lipoproteins, and peroxisome proliferator activated receptor-delta. *Am J Cardiol.* 2007;100(11 A):n20-n24. doi:10.1016/j.amjcard.2007.08.009.
87. Olson EJ, Pearce GL, Jones NP, Sprecher DL. Lipid effects of peroxisome proliferator-activated receptor- δ agonist GW501516 in subjects with low high-density lipoprotein cholesterol: characteristics of metabolic syndrome. *Arterioscl Thromb Vas.* 2012;32(9):2289-2294. doi:10.1161/ATVBAHA.112.247890.
88. Bishop-Bailey D, Bystrom J. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in inflammation. *Pharmacol Ther.* 2009;124(2):141-150. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.06.011.
89. Woods JW, Tanen M, Figueroa DJ, Biswas C, Zycband E, Moller DE, Austin CP, Berger JP. Localization of PPARdelta in murine central nervous system: expression in oligodendrocytes and neurons. *Brain Res.* 2003;975(1-2):10-21.
90. Cristiano L, Bernardo A, Cerù MP. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and peroxisomes in rat cortical and cerebellar astrocytes. *J Neurocytol.* 2001;30(8):671-683.
91. Akanuma S-I, Hori S, Ohtsuki S, Fujiyoshi M, Terasaki T. Expression of nuclear receptor mRNA and liver X receptor-mediated regulation of ABC transporter A1 at rat blood-brain barrier. *Neurochem Int.* 2008;52(4-5):669-674. doi:10.1016/j.neuint.2007.08.012.
92. Schnegg CI, Robbins ME. Neuroprotective Mechanisms of PPAR δ : Modulation of Oxidative Stress and Inflammatory Processes. *PPAR Res.* 2011;2011:373560. doi:10.1155/2011/373560.
93. Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(1):303-308. doi:10.1073/pnas.012610299.
94. Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol.* 2000;20(14):5119-5128.
95. Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Gene Dev.* 1996;10(8):974-984.
96. Wang Y-X, Zhang C-L, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, Evans RM. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol.* 2004;2(10):e294. doi:10.1371/journal.pbio.0020294.
97. Stokes S. GW501516 positives confirmed, three of four riders are from same BCR Pizza Hut team. Velonation. <http://www.velonation.com/News/ID/14381/GW501516-positives-confirmed-three->

- of-four-riders-are-from-same-BCR-Pizza-Hut-team.aspx. Published April 15, 2013. Accessed April 9, 2015.
98. Muscle NTB. GW-501516. <https://www.youtube.com/watch?v=H2GT5oqYEQE>. Published September 11, 2013. Accessed April 25, 2015.
 99. World Anti-Doping Agency. WADA issues alert on GW501516 (March 21, 2013). March 2013. <https://www.wada-ama.org/en/media/news/2013-03/wada-issues-alert-on-gw501516>.
 100. Takayama O, Yamamoto H, Damdinsuren B, Sugita Y, Ngan CY, Xu X, Tsujino T, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Expression of PPARdelta in multistage carcinogenesis of the colorectum: implications of malignant cancer morphology. *Brit J Cancer*. 2006;95(7):889-895. doi:10.1038/sj.bjc.6603343.
 101. Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(3):181-195. doi:10.1038/nrc3214.
 102. Mackenzie LS, Lione L. Harnessing the benefits of PPAR β/δ agonists. *Life Sci*. 2013;93(25-26):963-967. doi:10.1016/j.lfs.2013.10.022.
 103. Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol*. 2000;20(14):5119-5128. doi:10.1128/MCB.20.14.5119-5128.2000.
 104. Westergaard M, Henningsen J, Svendsen ML, Johansen C, Jensen UB, Schröder HD, Kratchmarova I, Berge RK, Iversen L, Bolund L, Kragballe K, Kristiansen K. Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid. *J Invest Dermatol*. 2001;116(5):702-712. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.doc.x.
 105. Tan NS, Michalik L, Noy N, Yasmin R, Pacot C, Heim M, Flühmann B, Desvergne B, Wahli W. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Gene Dev*. 2001;15(24):3263-3277. doi:10.1101/gad.207501.
 106. Grose R, Werner S. An aPPARently protective mechanism for keratinocytes in wounded skin. *Trends in molecular medicine*. April 2002:149-151.
 107. Chong HC, Tan MJ, Philippe V, Tan SH, Tan CK, Ku CW, Goh YY, Wahli W, Michalik L, Tan NS. Regulation of epithelial-mesenchymal IL-1 signaling by PPARbeta/delta is essential for skin homeostasis and wound healing. *J Cell Biol*. 2009;184(6):817-831. doi:10.1083/jcb.200809028.
 108. Sertznig P, Reichrath J. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in dermatology: Challenge and promise. *Dermatoendocrinol*. 2011;3(3):130-135. doi:10.4161/derm.3.3.15025.
 109. Hack K, Reilly L, Palmer C, Read KD, Norval S, Kime R, Booth K, Foerster J.

- Skin-Targeted Inhibition of PPAR β/δ by Selective Antagonists to Treat PPAR β/δ – Mediated Psoriasis-Like Skin Disease In Vivo. Brandner JM, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e37097. doi:10.1371/journal.pone.0037097.
110. Di-Poi N, Tan NS, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell*. 2002;10(4):721-733.
111. Rival Y, Benéteau N, Taillandier T, Pezet M, Dupont-Passelaigue E, Patoiseau JF, Junquéro D, Colpaert FC, Delhon A. PPARalpha and PPARdelta activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2002;435(2-3):143-151.
112. Planavila A, Rodríguez-Calvo R, Jové M, Michalik L, Wahli W, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2005;65(4):832-841. doi:10.1016/j.cardiores.2004.11.011.
113. Smeets PJH, Teunissen BEJ, Planavila A, de Vogel-van den Bosch H, Willemsen PHM, van der Vusse GJ, van Bilsen M. Inflammatory pathways are activated during cardiomyocyte hypertrophy and attenuated by peroxisome proliferator-activated receptors PPARalpha and PPARdelta. *J Biol Chem*. 2008;283(43):29109-29118. doi:10.1074/jbc.M802143200.
114. Rodríguez-Calvo R, Serrano L, Coll T, Moullan N, Sánchez RM, Merlos M, Palomer X, Laguna JC, Michalik L, Wahli W, Vázquez-Carrera M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor-kappaB activity via extracellular signal-related kinase 1/2. *Diabetes*. 2008;57(8):2149-2157. doi:10.2337/db08-0176.
115. Barish GD, Yu RT, Karunasiri M, Ocampo CB, Dixon J, Benner C, Dent AL, Tangirala RK, Evans RM. Bcl-6 and NF-kappaB cistromes mediate opposing regulation of the innate immune response. *Gene Dev*. 2010;24(24):2760-2765. doi:10.1101/gad.1998010.
116. Lee C-H, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science*. 2003;302(5644):453-457. doi:10.1126/science.1087344.
117. Takata Y, Liu J, Yin F, Collins AR, Lyon CJ, Lee C-H, Atkins AR, Downes M, Barish GD, Evans RM, Hsueh WA, Tangirala RK. PPARdelta-mediated antiinflammatory mechanisms inhibit angiotensin II-accelerated atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(11):4277-4282. doi:10.1073/pnas.0708647105.
118. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):279-289. doi:10.1038/nri2215.
119. Sakata Y, Dong J-W, Vallejo JG, Huang C-H, Baker JS, Tracey KJ, Tacheuchi O, Akira S, Mann DL. Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(1):H503-H509. doi:10.1152/ajpheart.00642.2006.

120. Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, Hall FW, Kiosses WB, Tobias PS, Mackman N, McKay DB. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol.* 2007;178(10):6252-6258.
121. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN, Stockinger B, Tak PP. The resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):59-66. doi:10.1038/nri3362.
122. Cekanaviciute E, Fathali N, Doyle KP, Williams AM, Han J, Buckwalter MS. Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice. *Glia.* 2014;62(8):1227-1240. doi:10.1002/glia.22675.
123. Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, Giese T, Veltkamp R. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med.* 2009;15(2):192-199. doi:10.1038/nm.1927.
124. Shichita T, Ito M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:319. doi:10.3389/fncel.2014.00319.
125. Kim HJ, Ham SA, Kim SU, Hwang J-Y, Kim J-H, Chang KC, Yabe-Nishimura C, Kim J-H, Seo HG. Transforming growth factor-beta1 is a molecular target for the peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Circ Res.* 2008;102(2):193-200. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.158477.
126. Fan Y, Wang Y, Tang Z, Zhang H, Qin X, Zhu Y, Guan Y, Wang X, Staels B, Chien S, Wang N. Suppression of pro-inflammatory adhesion molecules by PPAR-delta in human vascular endothelial cells. *Arterioscl Throm Vas.* 2008;28(2):315-321. doi:10.1161/ATVBAHA.107.149815.
127. Kang K, Reilly SM, Karabacak V, Gangl MR, Fitzgerald K, Hatano B, Lee C-H. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2008;7(6):485-495. doi:10.1016/j.cmet.2008.04.002.
128. Zhang R, Chopp M, Zhang Z, Jiang N, Powers C. The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 1998;785(2):207-214.
129. Yilmaz G, Granger DN. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. *Neuromol Med.* 2010;12(2):193-204. doi:10.1007/s12017-009-8074-1.
130. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukocyte Biol.* 2010;87(5):779-789. doi:10.1189/jlb.1109766.
131. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cerebr Blood F Met.* 1999;19(6):624-633. doi:10.1097/00004647-199906000-00005.
132. Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J,

Literaturverzeichnis

- Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cerebr Blood F Met.* 1999;19(9):1020-1028. doi:10.1097/00004647-199909000-00010.
133. Piqueras L, Sanz MJ, Perretti M, Morcillo E, Norling L, Mitchell JA, Li Y, Bishop-Bailey D. Activation of PPARbeta/delta inhibits leukocyte recruitment, cell adhesion molecule expression, and chemokine release. *J Leukocyte Biol.* 2009;86(1):115-122. doi:10.1189/jlb.0508284.
134. Girnun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins MEC. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Mol Endocrinol.* 2002;16(12):2793-2801. doi:10.1210/me.2002-0020.
135. Pesant M, Sueur S, Dutartre P, Tallandier M, Grimaldi PA, Rochette L, Connat J-L. Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) activation protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2006;69(2):440-449. doi:10.1016/j.cardiores.2005.10.019.
136. Yin K-J, Deng Z, Hamblin M, Zhang J, Chen YE. Vascular PPAR δ protects against stroke-induced brain injury. *Arterioscl Throm Vas.* 2011;31(3):574-581. doi:10.1161/ATVBAHA.110.221267.
137. Lai AY, Todd KG. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. *Can J Physiol Pharm.* 2006;84(1):49-59. doi:10.1139/Y05-143.
138. Denes A, Vidyasagar R, Feng J, Narvainen J, McColl BW, Kauppinen RA, Allan SM. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cerebr Blood F Met.* 2007;27(12):1941-1953. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600495.
139. Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science.* 2000;290(5497):1768-1771.
140. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee J-C, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *2006;9(7):917-924.* doi:10.1038/nn1715.
141. Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol.* 1992;149(8):2736-2741.
142. Zhou M, Wang CM, Yang W-L, Wang P. Microglial CD14 activated by iNOS contributes to neuroinflammation in cerebral ischemia. *Brain Res.* 2013;1506:105-114. doi:10.1016/j.brainres.2013.02.010.
143. Polak PE, Kalinin S, Russo Dello C, Gavrilyuk V, Sharp A, Peters JM, Richardson J, Willson TM, Weinberg G, Feinstein DL. Protective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta agonist in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2005;168(1-2):65-75.

doi:10.1016/j.jneuroim.2005.07.006.

144. Defaux A, Zurich M-G, Braissant O, Honegger P, Monnet-Tschudi F. Effects of the PPAR-beta agonist GW501516 in an in vitro model of brain inflammation and antibody-induced demyelination. *J Neuroinflammation*. 2009;6(1):15. doi:10.1186/1742-2094-6-15.
145. Arsenijevic D, de Bilbao F, Plamondon J, Paradis E, Vallet P, Richard D, Langhans W, Giannakopoulos P. Increased infarct size and lack of hyperphagic response after focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor β -deficient mice. *J Cerebr Blood F Met*. 2005;26(3):433-445. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600200.
146. Pialat J-B, Cho T-H, Beuf O, Joye E, Moucharraffie S, Moucharraffie S, Langlois J-B, Nemoz C, Janier M, Berthezene Y, Nighoghossian N, Desvergne B, Wiart M. MRI monitoring of focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-deficient mice. *NMR Biomed*. 2007;20(3):335-342. doi:10.1002/nbm.1157.
147. Iwashita A, Muramatsu Y, Yamazaki T, Muramoto M, Kita Y, Yamazaki S, Mihara K, Moriguchi A, Matsuoka N. Neuroprotective Efficacy of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor -Selective Agonists in Vitro and in Vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320(3):1087-1096. doi:10.1124/jpet.106.115758.
148. Yin K-J, Deng Z, Hamblin M, Xiang Y, Huang H, Zhang J, Jiang X, Wang Y, Chen YE. Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury. 2010;30(18):6398-6408. doi:10.1523/JNEUROSCI.0780-10.2010.
149. Glatz T, Stöck I, Nguyen-Ngoc M, Gohlke P, Herdegen T, Culman J, Zhao Y. Peroxisome-proliferator-activated receptors γ and peroxisome-proliferator-activated receptors β/δ and the regulation of interleukin 1 receptor antagonist expression by pioglitazone in ischaemic brain. *J Hypertens*. 2010;28(7):1488-1497. doi:10.1097/HJH.0b013e3283396e4e.
150. Ji S, Kronenberg G, Balkaya M, Färber K, Gertz K, Kettenmann H, Endres M. Acute neuroprotection by pioglitazone after mild brain ischemia without effect on long-term outcome. *Exp Neurol*. 2009;216(2):321-328. doi:10.1016/j.expneurol.2008.12.007.
151. Sakamoto J, Kimura H, Moriyama S, Odaka H, Momose Y, Sugiyama Y, Sawada H. Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochem Bioph Res Co*. 2000;278(3):704-711. doi:10.1006/bbrc.2000.3868.
152. Chao X, Xiong C, Dong W, Qu Y, Ning W, Liu W, Han F, Ma Y, Wang R, Fei Z, Han H. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ attenuates acute ischemic stroke on middle cerebral ischemia occlusion in rats. *J Stroke Cerebrovasc*. 2014;23(6):1396-1402. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.11.021.
153. STAIR STAIR. Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development. *Stroke*. 1999;30(12):2752-

2758.

154. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH, STAIR Group. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke*. 2009;40(6):2244-2250. doi:10.1161/STROKEAHA.108.541128.
155. Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V. Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp*. 2011;(47). doi:10.3791/2423.
156. Dirnagl U. Standard operating procedures (SOP) in experimental stroke research: SOP for middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Nature Precedings*. 2012;(713). doi:10.1038/npre.2012.3492.3.
157. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17(3):472-476.
158. Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragter. Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere
http://www.charite.de/tierschutz/download/Abbruchkriterien-Berliner-TSchB_2Auflage2009.pdf.
http://www.charite.de/tierschutz/download/Abbruchkriterien-Berliner-TSchB_2Auflage2009.pdf. Published July 22, 2009. Accessed April 12, 2015.
159. Hetze S, Römer C, Teufelhart C, Meisel A, Engel O. Journal of Neuroscience Methods. *J Neurosci Meth*. 2012;206(1):7-14. doi:10.1016/j.jneumeth.2012.02.001.
160. Balkaya M, Kröber J, Gertz K, Peruzzaro S, Endres M. Characterization of long-term functional outcome in a murine model of mild brain ischemia. *J Neurosci Meth*. 2013;213(2):179-187. doi:10.1016/j.jneumeth.2012.12.021.
161. Matsuura K, Kabuto H, Makino H, Ogawa N. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *J Neurosci Meth*. 1997;73(1):45-48.
162. Royl G, Balkaya M, Lehmann S, Lehnardt S, Stohlmann K, Lindauer U, Endres M, Dirnagl U, Meisel A. Effects of the PDE5-inhibitor vardenafil in a mouse stroke model. *Brain Res*. 2009;1265:148-157. doi:10.1016/j.brainres.2009.01.061.
163. Prinz V, Laufs U, Gertz K, Kronenberg G, Balkaya M, Leithner C, Lindauer U, Endres M. Intravenous rosuvastatin for acute stroke treatment: an animal study. *Stroke*. 2008;39(2):433-438. doi:10.1161/STROKEAHA.107.492470.
164. Guo Q, Wang G, Liu X, Namura S. Effects of gemfibrozil on outcome after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res*. 2009;1279:121-130. doi:10.1016/j.brainres.2009.04.055.
165. Freret T, Bouet V, Leconte C, Roussel S, Chazalviel L, Divoux D, Schumann-Bard

- P, Boulouard M. Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test. *Behav Neurosci.* 2009;123(1):224-230. doi:10.1037/a0014157.
166. Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim).* 1957;46(3):208-209.
167. Jones BJ, Roberts DJ. A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1968;259(2):211.
168. Wang X, Xu L, Wang H, Zhan Y, Puré E, Feuerstein GZ. CD44 deficiency in mice protects brain from cerebral ischemia injury. *J Neurochem.* 2002;83(5):1172-1179.
169. Ferrara A, Bejaoui El S, Seyen S, Tirelli E, Plumier J-C. The usefulness of operant conditioning procedures to assess long-lasting deficits following transient focal ischemia in mice. *Behav Brain Res.* 2009;205(2):525-534. doi:10.1016/j.bbr.2009.08.011.
170. Schallert T, Upchurch M, Lobaugh N, Farrar SB, Spirduso WW, Gilliam P, Vaughn D, Wilcox RE. Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacol Biochem Behav.* 1982;16(3):455-462.
171. Schallert T, Upchurch M, Wilcox RE, Vaughn DM. Posture-independent sensorimotor analysis of inter-hemispheric receptor asymmetries in neostriatum. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;18(5):753-759.
172. Zhang L, Schallert T, Zhang ZG, Jiang Q, Arniago P, Li Q, Lu M, Chopp M. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Meth.* 2002;117(2):207-214.
173. Lubjuhn J, Gastens A, Wilpert von G, Bargiotas P, Herrmann O, Murikinati S, Rabie T, Marti H, Amende I, Hampton TG, Schwaninger M. Functional testing in a mouse stroke model induced by occlusion of the distal middle cerebral artery. *J Neurosci Meth.* 2009;184(1):95-103. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.07.029.
174. Tennant KA, Jones TA. Sensorimotor behavioral effects of endothelin-1 induced small cortical infarcts in C57BL/6 mice. *J Neurosci Meth.* 2009;181(1):18-26. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.04.009.
175. Lin TN, He YY, Wu G, Khan M, Hsu CY. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke.* 1993;24(1):117-121.
176. Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“ □. *Ber Dtsch Chem Ges.* 1879;12(1):426-428. doi:10.1002/cber.187901201117.
177. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells.

Literaturverzeichnis

- Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(23):10480-10484.
178. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
179. Williams RL, Courtneidge SA, Wagner EF. Embryonic lethality and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. *Cell.* 1988;52(1):121-131.
180. Montesano R, Pepper MS, Möhle-Steinlein U, Risau W, Wagner EF, Orci L. Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell.* 1990;62(3):435-445.
181. Sikorski EE, Hallmann R, Berg EL, Butcher EC. The Peyer's patch high endothelial receptor for lymphocytes, the mucosal vascular addressin, is induced on a murine endothelial cell line by tumor necrosis factor-alpha and IL-1. *J Immunol.* 1993;151(10):5239-5250.
182. Schlattmann P, Dirnagl U. Statistics in experimental cerebrovascular research: comparison of more than two groups with a continuous outcome variable. *J Cerebr Blood F Met.* 2010;30(9):1558-1563. doi:10.1038/jcbfm.2010.95.
183. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL-1 and Interferon-Gamma - Tissue Distribution, Biochemistry, and Function of a Natural Adherence Molecule (Icam-1). *J Immunol.* 1986;137(1):245-254.
184. Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A Human Intercellular Adhesion Molecule (Icam-1) Distinct From Lfa-1. *J Immunol.* 2011;186(9):5034-5038.
185. Hackam DG, Redelmeier DA. Translation of research evidence from animals to humans. *Jama.* 2006;296(14):1731-1732. doi:10.1001/jama.296.14.1731.
186. Kimmelman J, Mogil JS, Dirnagl U. Distinguishing between Exploratory and Confirmatory Preclinical Research Will Improve Translation. Jones DR, ed. *PLoS Biol.* 2014;12(5):e1001863. doi:10.1371/journal.pbio.1001863.
187. Dirnagl U. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cerebr Blood F Met.* 2006;26(12):1465-1478. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600298.
188. Miura Y, Grocott HP, Bart RD, Pearlstein RD, Dexter F, Warner DS. Differential effects of anesthetic agents on outcome from near-complete but not incomplete global ischemia in the rat. *Anesthesiology.* 1998;89(2):391-400.
189. Beckmann N. High resolution magnetic resonance angiography non-invasively reveals mouse strain differences in the cerebrovascular anatomy in vivo. *Magn Reson Med.* 2000;44(2):252-258. doi:10.1002/1522-2594(200008)44:2%3C252::AID-MRM12%3E3.0.CO;2-G/asset/12_ftp.pdf.
190. Barone FC, Knudsen DJ, Nelson AH, Feuerstein GZ, Willette RN. Mouse Strain Differences in Susceptibility to Cerebral Ischemia Are Related to Cerebral Vascular Anatomy. *J Cerebr Blood F Met.* 1993;13(4):683-692. doi:10.1038/jcbfm.1993.87.

Literaturverzeichnis

191. Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*. 2005;2(3):396-409. doi:10.1602/neurorx.2.3.396.
192. Macleod MR, O'Collins T, Horvath LL, Howells DW, Donnan GA. Systematic review and metaanalysis of the efficacy of FK506 in experimental stroke. *J Cerebr Blood F Met*. 2005;25(6):713-721. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600064.
193. Macleod MR, van der Worp HB, Sena ES, Howells DW, Dirnagl U, Donnan GA. Evidence for the efficacy of NXY-059 in experimental focal cerebral ischaemia is confounded by study quality. *Stroke*. 2008;39(10):2824-2829. doi:10.1161/STROKEAHA.108.515957.
194. Barak Y, Sadovsky Y, Shalom-Barak T. PPAR Signaling in Placental Development and Function. *PPAR Res*. 2008;2008(3):142082–11. doi:10.1155/2008/142082.
195. Piqueras L, Reynolds AR, Hodiwalla-Dilke KM, Alfranca A, Redondo JM, Hatae T, Tanabe T, Warner TD, Bishop-Bailey D. Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscl Throm Vas*. 2007;27(1):63-69. doi:10.1161/01.ATV.0000250972.83623.61.
196. Li X, Blizzard KK, Zeng Z, DeVries AC, Hurn PD, McCullough LD. Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse: functional recovery and the effects of gender. *Exp Neurol*. 2004;187(1):94-104. doi:10.1016/j.expneurol.2004.01.004.
197. Kuroda S, Tsuchida R, Smith ML, Maples KR, Siesjö BK. Neuroprotective effects of a novel nitron, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cerebr Blood F Met*. 1999;19(7):778-787. doi:10.1097/00004647-199907000-00008.
198. Savitz SI, Schäbitz W-R. A Critique of SAINT II: wishful thinking, dashed hopes, and the future of neuroprotection for acute stroke. *Stroke*. 2008;39(4):1389-1391. doi:10.1161/STROKEAHA.107.504415.
199. Romanowska M, Yacoub al N, Seidel H, Donandt S, Gerken H, Phillip S, Haritonova N, Artuc M, Schweiger S, Sterry W, Foerster J. PPARdelta enhances keratinocyte proliferation in psoriasis and induces heparin-binding EGF-like growth factor. *J Invest Dermatol*. 2008;128(1):110-124. doi:10.1038/sj.jid.5700943.
200. Romanowska M, Reilly L, Palmer CNA, Gustafsson MCU, Foerster J. Activation of PPARbeta/delta causes a psoriasis-like skin disease in vivo. Zimmer J, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(3):e9701. doi:10.1371/journal.pone.0009701.
201. Balkaya M, ber JMKO, Rex A, Endres M. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J Cerebr Blood F Met*. 2012;33(3):330-338. doi:10.1038/jcbfm.2012.185.
202. Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadingham SJ, Parsons AA. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology*. 2000;39(5):806-816.
203. Liang Y-J, Liu Y-C, Chen C-Y, Lai L-P, Shyu K-G, Juang S-J, Wang B-W, Leu JG.

- Comparison of PPAR δ and PPAR γ in inhibiting the pro-inflammatory effects of C-reactive protein in endothelial cells. *Int J Cardiol.* 2010;143(3):361-367. doi:10.1016/j.ijcard.2009.03.100.
204. Macleod MR, Fisher M, O'Collins V, Sena ES, Dirnagl U, Bath PMW, Buchan A, van der Worp HB, Traystman R, Minematsu K, Donnan GA, Howells DW. Good laboratory practice: preventing introduction of bias at the bench. *Stroke.* 2009;40(3):e50-e52. doi:10.1161/STROKEAHA.108.525386.
205. O'Collins VE, Macleod MR, Cox SF, Van Raay L, Aleksoska E, Donnan GA, Howells DW. Preclinical drug evaluation for combination therapy in acute stroke using systematic review, meta-analysis, and subsequent experimental testing. *J Cerebr Blood F Met.* 2011;31(3):962-975. doi:10.1038/jcbfm.2010.184.
206. Prinz F, Schlange T, Asadullah K. Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(9):712-712. doi:10.1038/nrd3439-c1.
207. Begley CG, Ellis LM. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nat Neurosci.* 2012;483(7391):531-533. doi:10.1038/483531a.
208. Ioannidis JPA. Why Most Published Research Findings Are False. *PLoS Med.* 2005;2(8):e124. doi:10.1371/journal.pmed.0020124.
209. Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ESJ, Ograves MRM. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(5):365-376. doi:10.1038/nrn3475.
210. Sena ES, Briscoe CL, Howells DW, Donnan GA, Sandercock PAG, Macleod MR. Factors affecting the apparent efficacy and safety of tissue plasminogen activator in thrombotic occlusion models of stroke: systematic review and meta-analysis. *J Cerebr Blood F Met.* 2010;30(12):1905-1913. doi:10.1038/jcbfm.2010.116.
211. Perucca P, O'Brien TJ. Novel and large collaborations drive advances in epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2015;11(2):74-75. doi:10.1038/nrneurol.2014.255.
212. Dirnagl U, Fisher M. International, multicenter randomized preclinical trials in translational stroke research: it's time to act. *J Cerebr Blood F Met.* 2012;32(6):933-935. doi:10.1038/jcbfm.2012.51.
213. Ioannidis JPA. How to Make More Published Research True. *PLoS Med.* 2014;11(10):e1001747. doi:10.1371/journal.pmed.1001747.
214. Dirnagl U, Endres M. Found in translation: preclinical stroke research predicts human pathophysiology, clinical phenotypes, and therapeutic outcomes. *Stroke.* 2014;45(5):1510-1518. doi:10.1161/STROKEAHA.113.004075.
215. Sena ES, van der Worp HB, Bath PMW, Howells DW, Macleod MR. Publication Bias in Reports of Animal Stroke Studies Leads to Major Overstatement of Efficacy. Roberts I, ed. *PLoS Biol.* 2010;8(3):e1000344. doi:10.1371/journal.pbio.1000344.

Literaturverzeichnis

216. Howells DW, Sena ES, O'Collins V, Macleod MR. Improving the efficiency of the development of drugs for stroke. *Int J Stroke*. 2012;7(5):371-377. doi:10.1111/j.1747-4949.2012.00805.x.
217. Bath PMW, Macleod MR, Green AR. Emulating multicentre clinical stroke trials: a new paradigm for studying novel interventions in experimental models of stroke. *Int J Stroke*. 2009;4(6):471-479. doi:10.1111/j.1747-4949.2009.00386.x.
218. Llovera G, Hofmann K, Roth S, Salas-Pérdomo A, Ferrer-Ferrer M, Perego C, Zanier ER, Mamrak U, Rex A, Party H, Agin V, Fauchon C, Orset C, Haelewyn B, De Simoni M-G, Dirnagl U, Grittner U, Planas AM, Plesnila N, Vivien D, Liesz A. Results of a preclinical randomized controlled multicenter trial (pRCT): Anti-CD49d treatment for acute brain ischemia. *Sci Transl Med*. 2015;7(299):299ra121-299ra121. doi:10.1126/scitranslmed.aaa9853.
219. Vesterinen HV, Egan K, Deister A, Schlattmann P, Macleod MR, Dirnagl U. Systematic survey of the design, statistical analysis, and reporting of studies published in the 2008 volume of the Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. *J Cerebr Blood F Met*. 2010;31(4):1064-1072. doi:10.1038/jcbfm.2010.217.
220. Darwin Correspondence Project. Six things Darwin never said - and one he did. darwinproject.ac.uk. <https://www.darwinproject.ac.uk/six-things-darwin-never-said>. Accessed April 24, 2015.

Abkürzungsverzeichnis

AF-1	ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion
AF-2	ligandenabhängige Aktivierungsfunktion
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AP	Aktivator Protein
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	<i>BCL2-Associated X Protein</i>
BBB	Blut-Hirn-Schranke (<i>blood brain barrier</i>)
BCL	<i>B-cell lymphoma</i>
BSA	bovines Serum Albumin
Caspase	<i>cysteine-aspartic acid protease</i>
CCA	Arteria carotis communis (<i>common carotid artery</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CX3C	<i>C-X3-C motif</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DR	<i>direct repeat</i>
ECA	Arteria carotis externa (<i>external carotid artery</i>)
Epo	Erythropoetin

ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fas	<i>first apoptosis signal</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FKS	fetales Kälberserum
FSC	<i>forward-scatter</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICA	Arteria carotis interna (<i>internal carotid artery</i>)
ICAM	<i>intracellular-adhesion-molecule</i>
IGF	Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (<i>Insulin-like growth factors</i>)
IL	Interleukin
IL-1ra	IL-1-Rezeptroantagonisten
INF	Interferon
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	Knock-Out
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCA	Arteria cerebri media (<i>middle cerebral artery</i>)
MCAo	<i>middle cerebral artery occlusion</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
min	Minuten
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MnSOD	<i>manganese superoxid dismutase</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MSOP	<i>minimum standard of performance</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-Test
NADH	Nicotinamidadeninukleotid
NCoR	<i>nuclear receptor co-repressor</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NMDA	N-Methyl-D-aspartic acid
NO	Stickstoffmonoxid
NUC	<i>nuclear hormone receptor</i>
PBP	PPAR binding protein
PBP PPAR	<i>binding protein</i>
PBS	<i>phosphate buffer solution</i>
PGC	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator</i>
PPAR	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>

PPRE	<i>PPAR response element</i>
PPV	Positiver Prädiktiver Werts (<i>postive predictive value</i>)
PXR	<i>pregnant x receptors</i>
R	Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Hypothese vor dem Durchführen der Studie
RGS	<i>regulator of G-protein signaling</i>
rhIL-1Ra	<i>recombinant human IL-1 receptor antagonist</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SMRT	<i>silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor</i>
SOD	Superoxiddismutase
SOP	Standard Operating Procedures
SRC	<i>steroid receptor co-activator</i>
SSC	<i>side-scatter</i>
STAIR	<i>Stroke Therapy Academic Industry Roundtable</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
t-PA	<i>tissue plasminogen activator</i>
TBL	<i>Transducin β-like</i>
TBLR	<i>Transducin β-like related protein</i>
TD	<i>time down</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproeinase</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TT	time turn
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Vereinfachte Darstellung der nach einem Schlaganfall ablaufenden Prozesse	4
Abb. 1.2: Stark vereinfachte Darstellung der ischämischen Kaskade	5
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines nukleären Rezeptors	8
Abb. 1.4: Molekulare Effekte einer PPAR δ -Aktivierung	11
Abb. 1.5: Postischämische Inflammation und PPAR δ -Angriffspunkte	13
Abb. 2.1: Pharmakokinetik von SAR145	27
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der MCAo	30
Abb. 2.3: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Versuche 1a/b und 2	40
Abb. 2.4: Zeitpunkte der Durchführung der Verhaltenstests und der MRT Untersuchung	40
Abb. 2.5: Repräsentative <i>gating</i> -Strategie zur Analyse der bEnd.3 Zellen	44
Abb. 3.1: Infarktgröße in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis von SAR145	48
Abb. 3.2: Infarktgröße in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der ersten Gabe von SAR145	50
Abb. 3.3: Kaplan-Meier-Kurve des Anteils der überlebenden Knock-out- und Wildtyp-Tiere	51
Abb. 3.4: Infarktgrößen der Vehikel- und Verumgruppen der Knock-out- und der Wildtyp-Tiere	52
Abb. 3.5: Gewichtsverlauf der Vehikel- und der Verumgruppe über 28 Tage	54
Abb. 3.6: Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenswahrscheinlichkeit in der Langzeitbeobachtung	54
Abb. 3.7: Ergebnisse RotaRod der Vehikel- und Verumgruppe	55
Abb. 3.8: Ergebnisse Corner Test der Vehikel- und Verumgruppe	56
Abb. 3.9: Ergebnisse Pole Test der Vehikel- und Verumgruppe	57
Abb. 3.10: Verlauf der maximalen Kontaktfläche der Vorder- und Hinterläufe über die Zeit	58
Abb. 3.11: Effekte der Behandlung mit SAR145 auf die Mikrogliaaktivierung durch LPS	61
Abb. 3.12: Repräsentative Ergebnisse der ICAM-1-Expression auf bEnd.3 Zellen mit und ohne Stimulation durch TNF α und Behandlung mit SAR145	63

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Wichtige Mediatoren postischämischer Inflammation	16
Tab. 3.1: Übersicht über alle verwendeten Tiere	46
Tab. 4.1: Übersicht über bisherige Studien zu PPAR δ -Agonisten in Schlaganfallmodellen	79

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Samuel Knauss, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neuroprotektion durch den PPAR δ -Agonisten SAR145 in einem murinen Modell des ischämischen Schlaganfalls“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias Endres für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Bei Prof. Dr. Ulrich Dirnagl möchte ich mich für die wichtigen Inspirationen und die ausführlichen Diskussionen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zudem Dr. Alexander Kunz für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Seine Unterstützung und seine Offenheit für neue Ideen, sowie die bereichernden Gespräche haben mir beim Verfassen dieser Promotion sehr geholfen.

Diese Arbeit wäre nicht denkbar ohne die Hilfe von Petra Loge. Dabei möchte ich mich für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und kompetente praktische Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt auch dem Sonderforschungsbereich/Transregio 43 „Inflammatorische Prozesse im Gehirn“ für die Unterstützung dieser Doktorarbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank dem gesamten Team der Experimentellen Neurologie. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Dorette Freyer, Dr. Andre Rex, Dr. René Bernard, Dr. Susanne Müller, Dr. Ingo Przesdzing und Valerie Boujon bedanken.