

Aus dem
CharitéCentrum für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurologie
Direktor: Professor Dr. med. Karl M. Einhäupl

HABILITATIONSSCHRIFT

Experimentelle Schlaganfallforschung *in vivo*: Vom Schadensmodell zum Verständnis klinisch relevanter Pathophysiologie

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. Konstantin Prass
geboren am 17.01.1971 in Eberswalde

Öffentlich – wissenschaftlicher Vortrag: 22.04.2009

1. Gutachter Prof. Dr. med. G. Stoll
2. Gutachter Prof. Dr. med. W. Kuschinsky

Vorbemerkungen

Der Schlaganfall ist eine häufige Erkrankung, die für die Betroffenen und deren Angehörige oft zu einer enormen Belastung führt. Trotz großer wissenschaftlicher Anstrengungen sind viele Fragen ungelöst und sind unsere therapeutischen Möglichkeiten noch sehr begrenzt. Zu unserem Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankung hat die experimentelle Schlaganfallforschung wesentlich beigetragen. Viele unserer Erkenntnisse sind nicht durch klinische Studien abgesichert, da diese einen hohen Aufwand erfordern, erhebliche ethische Anforderungen haben und die notwendigen Studienpopulationen oft sehr groß sind. Deshalb müssen wir auch bei der Formulierung von Therapieempfehlungen auch auf tierexperimentelle Daten zurückgreifen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Das Mausmodell der fokalen zerebralen Ischämie.....	9
2 Darstellung und Diskussion eigener Forschungsergebnisse	12
2.1 Das Schadensmodell - MCAO.....	12
2.2 Präkonditionierung - Induzierte Ischämietoleranz	13
2.2.1 Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff.....	15
2.2.2 HIF-1 abhängige Präkonditionierung	16
2.3 Schlaganfall – induzierte Immundepression.....	18
3 Zusammenfassung.....	23
Literaturverzeichnis	26
Danksagung	33
Zusammenstellung wesentlicher Publikationen	34
Eidesstattliche Versicherung.....	90

Publikationen die Gegenstand dieser Habilitationsschrift sind

(angefügt ab Seite 34, im Text fettgedruckter Seitenverweis)

1. **Prass K**, Wiegand F, Schumann P, Ahrens M, Kapinya K, Harms C, Liao W, Trendelenburg G, Gertz K, Moskowitz MA, Knapp F, Victorov IV, Megow D, Dirnagl U. Hyperbaric oxygenation induced tolerance against focal cerebral ischemia in mice is strain dependent. *Brain Res.* 2000 Jul 14;871(1):146-50.
2. Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, **Prass K**, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med.* 2001 Dec;7(12):1356-61.
3. **Prass K**, Ruscher K, Karsch M, Isaev N, Megow D, Priller J, Scharff A, Dirnagl U, Meisel A. Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 May;22(5):520-5.
4. **Prass K***, Meisel C*, Hoflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med.* 2003 Sep 1;198(5):725-36.
5. **Prass K**, Scharff A, Ruscher K, Lowl D, Muselmann C, Victorov I, Kapinya K, Dirnagl U, Meisel A. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke.* 2003 Aug;34(8):1981-6.
6. Meisel C*, **Prass K***, Braun J, Victorov I, Wolf T, Megow D, Halle E, Volk HD, Dirnagl U, Meisel A. Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. *Stroke.* 2004 Jan;35(1):2-6.
7. Braun JS*, **Prass K***, Dirnagl U, Meisel A, Meisel C. Protection from brain damage and bacterial infection in murine stroke by the novel caspase-inhibitor Q-VD-OPH. *Exp Neurol.* 2007 Aug;206(2):183-91.

(* äquivalenter Beitrag der Autoren)

Abkürzungsverzeichnis

AB	– Arteria basilaris
ACA	– Arteria cerebri anterior
ACC	– Arteria carotis communis
ACE	– Arteria carotis externa
ACI	– Arteria carotis interna
ACM	– Arteria cerebri media
ACP	– Arteria cerebri posterior
Akt	– Proteinkinase B
BAD	– <i>Bcl-2-Antagonist of Cell Death</i>
CFU	– <i>colony forming unit</i>
CIDS	– <i>central nervous system injury induced immunodeficiency syndrome</i>
DFX	– Desferrioxamin
EPO	– Erythropoietin
FACS	– <i>fluorescence activated cell sorting</i>
GFP	– grün fluoreszierendes Protein
HIF-1	– Hypoxie – induzierbarer Faktor 1
IFN- γ	– Interferon gamma
JAK2	– Janus – Kinase 2
MCAO	– <i>middle cerebral artery occlusion</i>
NF- κ B	– nukleärer Faktor Kappa B
OPH	– N-(2Quinoly)valyl-aspartyl 2,6-difluorophenoxymethylketon
PAT	– präventive antiinfektive Therapie
PI3K	– Phosphoinositol – 3 - Kinase
RT-PCR	– Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SAP	– Schlaganfall – assoziierte Pneumonie
SIDS	– Schlaganfall – induziertes Immundepressionssyndrom
TNF- α	– Tumornekrosefaktor alpha

1 Einleitung

Jedes Jahr erleiden in Deutschland ungefähr 150.000 Menschen einen Schlaganfall (Kolominsky – Rabas, 2004). Diese Erkrankung ist in industrialisierten Ländern die 3.häufigste Todesursache und Hauptgrund für Langzeitpflegebedürftigkeit. Die einzige kausal orientierte Behandlung die zur Verfügung steht, die Thrombolyse, wird derzeit nur bei 2-4% aller Betroffenen eingesetzt (Alev et al., 2007). Umso wichtiger ist für die Schlaganfallpatienten eine optimale Versorgung, welche auf einer spezialisierten *stroke unit* erfolgt. In Deutschland können heute mehr als die Hälfte aller akut Erkrankten auf einer Schlaganfallstation betreut werden. (Weimar et al., 2007). Die Überlegenheit des Stroke – Unit – Konzepts gegenüber einer Versorgung mit einem Stroke – Team oder einer Betreuung auf einer internistischen, respektive neurologischen Normalstation gilt als wissenschaftlich gesichert (Díez – Tejedor und Fuentes, 2001; Fuentes et al., 2006). Sowohl die Sterblichkeit, das Ausmaß der verbleibenden Behinderung und die Häufigkeit einer anschließend notwendigen institutionalisierten Pflege können durch eine Behandlung auf einer *stroke unit* gesenkt werden (Leys et al., 2007).

Das aktuell favorisierte Schlaganfallstationskonzept spezialisiert sich rein auf die Betreuung von akuten Schlaganfallpatienten (*dedicated stroke unit*). Dazu werden die akutmedizinische Behandlung mit früh beginnenden rehabilitativen Maßnahmen auf einer spezialisierten Überwachungsstation zusammengeführt. Neben besonderen apparativen und strukturellen Ressourcen bedarf es dazu eines erheblichen personellen Aufwandes, der z.B. die 24-stündige Anwesenheit eines Neurologen, die Verfügbarkeit von Neuroradiologen, Kardiologen, Physiotherapeuten sowie speziell geschultem Pflegepersonal notwendig macht. Außerdem ist ein hoher Ausbildungsstandard aller beteiligten Berufsgruppen und deren kontinuierliche Fortbildung notwendig, um den Erfolg dieses Therapiekonzeptes zu sichern (Leys et al., 2007).

Die integrative Betreuung auf einer Schlaganfallstation umfasst neben der Akuttherapie (Thrombolyse) die Basistherapie (allgemeinmedizinische Behandlung

zur Aufrechterhaltung physiologischer Vitalparameter vor allem Blutdruck, Blutzucker, Sauerstoffsättigung, Körpertemperatur), die rasche ätiologische Diagnostik, das individuelle Komplikationsmanagement, die frühe Sekundärprophylaxe und die Frührehabilitation (Klijn et al., 2003; Weimar et al., 2007). Um ein hohes Maß an Standardisierung zu ermöglichen, werden dazu von Fachgesellschaften Therapieempfehlungen fortlaufend aktualisiert, die in hausinterne Richtlinien (*standard operating procedures*) umgesetzt werden sollen (Külkens et al., 2004).

Die Empfehlungen zur Akutbehandlung des Schlaganfalls gründen vor allem auf unserem veränderten pathophysiologischen Verständnis der Erkrankung. Dieses ist in den letzten Jahren zu einem komplexen Modell ausgebaut worden (zur Übersicht Dirnagl et al., 1999). Die daraus abgeleiteten Empfehlungen zur Basistherapie stützen sich im Wesentlichen auf tierexperimentelle Untersuchungen. Klinische Therapiestudien, die diese Konzepte solide stützen fehlen derzeit großteils (Mergenthaler et al., 2004; Harms et al., 2004). Wenn auch Tierexperimente nicht frei von ethischen Bedenken sind, sind die Befunde der *in vivo* Forschung doch wesentlich für die Entwicklung von Therapieempfehlungen geworden.

Unsere pathophysiologische Vorstellung vom ischämischen Schlaganfall wird heute am besten durch eine komplexe Schadenskaskade beschrieben, an deren Anfang das akute Perfusionsdefizit steht. Nachfolgend ausgelöste Ereignisse verlaufen teilweise aktiv, also energieverbrauchend und beziehen die Protein *de novo* Synthese und Genexpression mit ein. Neben destruktiven Phänomenen werden auch endogen – protektive Signalwege aktiviert deren Entdeckung Hoffnung auf neuartige Therapieansätze geweckt hat (Dirnagl et al., 1999).

Ich fasse hier tierexperimentelle Arbeiten zusammen, die sich aus klinischen Fragestellungen ergeben haben, in denen wir drei pathophysiologisch relevanten Hypothesen nachgegangen sind:

1. Unser Schlaganfallmodell lässt sich als cerebrales Schadensmodell einsetzen, um das Regenerationspotential endogener Knochenmarkzellen zu untersuchen.
2. Es ist möglich, Toleranz vor einem experimentellen Schlaganfall zu induzieren, in dem geeignete systemische Stimuli zuvor subletal appliziert werden.
3. Der Schlaganfall führt zu einer schweren systemischen Immundepression, die das Auftreten der häufigen Schlaganfall- assoziierten Pneumonien begünstigt.

1.1 Das Mausmodell der fokalen zerebralen Ischämie

Trotz einiger Limitationen ist die Maus ein wichtiger Modellorganismus für die Schlaganfallforschung (Mergenthaler et al., 2004). Neben trivialen Argumenten (kleines Säugetier, hohe Fortpflanzungsfrequenz, langjährige Modellerfahrung), die sie zu einer universell eingesetzten Spezies der biologischen Forschung gemacht haben, sprechen die vielen verfügbaren Ischämie Modelle, deren breite Akzeptanz (Durukan und Tatlisumak, 2007) und die Möglichkeiten der induzierten Gendefizienz (Knockout - Tiere) für diese Spezies.

Als ein experimenteller Standard gilt heute das von Hara 1996 beschriebene, so genannte „Fadenokklusionsmodell“ der Maus (Hara et al., 1996). Wir haben dieses Modell adaptiert (Abb. 1) und für die meisten der hier zusammengefassten Befunde eingesetzt.

In allgemeiner Anästhesie wird nach Hautschnitt die Bifurkation der Arteria carotis dargestellt. Die Arteria carotis communis (ACC) und Arteria carotis externa werden mit einem Faden verschlossen. Es erfolgt eine kleine Arteriotomie der distalen ACC, durch die der Fadenokkluder eingeführt wird. Dieses dünne (8-0 USP) Nylonfilament ist am Ende mit Silikon beschichtet. Das Filament wird über die Arteria carotis interna (ACI) bis zum Abgang der Arteria cerebri media vorgeschoben, wodurch er dieses Gefäß verschließt (MCAO – *middle cerebral artery occlusion*). Ein um die ACI und den Okkluder geknoteter Faden verhindert ein

vorzeitiges Zurückgleiten des Filamentes. Das Tier kann nun aufwachen und wird dann neurologisch untersucht. Zur Reperfusion des ACM – Stromgebietes kann das Filament in erneuter Anästhesie wieder entnommen werden.

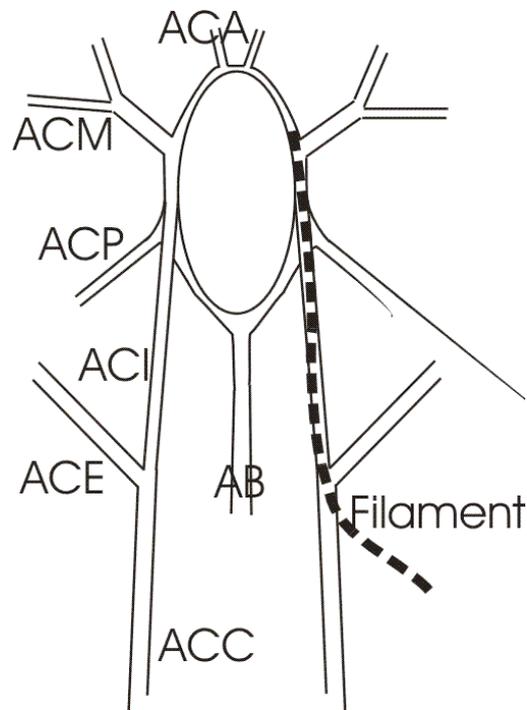


Abb. 1 Schematische Darstellung der Hirnbasisarterien der Maus und des präparativen Zugangs zum Verschluss der Arteria cerebri media

ACA – Arteria cerebri anterior, ACM – Arteria cerebri media, ACP – Arteria cerebri posterior, AB – Arteria basilaris, ACE – Arteria carotis externa, ACI – Arteria carotis interna, ACC – Arteria carotis communis, Filament – Fadenokkluder.

Trotz beachtenswerter experimenteller Störfaktoren wie der Anästhesie, dem Einbringen eines Fremdkörpers ins Gefäßsystem, der notwendigen großen Halspräparation, dem dauerhaften Verschluss der ACC durch die Präparation sprechen vor allem die leichte Erlernbarkeit, die geringe Präparationszeit, die gute Reproduzierbarkeit der Befunde und die Möglichkeit, mit einer Präparation unterschiedlich lange Ischämien zu erzeugen für dieses Modell. Die weite Modellverbreitung in der Literatur hat außerdem zur Vergleichbarkeit der Befunde

aus unterschiedlichen Arbeitsgruppen geführt. Als wichtige experimentelle Zielgrößen sind das resultierende Infarktvolumen (bspw. histologisch an Gefrierschnitten bestimmt) und das neurologische Defizit akzeptiert.

2 Darstellung und Diskussion eigener Forschungsergebnisse

2.1 Das Schadensmodell - MCAO

Die Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Josef Priller (Klinik für Psychiatrie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) beschäftigt sich mit dem Regenerationspotential von Knochenmarkszellen. Nachdem Arbeiten anderer Gruppen publiziert wurden, die die Fähigkeit von injizierten Knochenmarkszellen zum Ersatz von geschädigten Kardiomyozyten (Orlic et al., 2001) und Nervenzellen (Chen et al., 2001) zeigten, konzentrierte sich Herr Prof. Priller auf die Fragestellung, ob auch endogene Mechanismen der Mobilisation von Knochenmarksstammzellen in das geschädigte ZNS existieren.

Herr Prof. Priller entwickelte dazu eine Maus – Chimäre, deren Knochenmark mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) markiert wurde (**Seite 42**). Als akuten ZNS – Schaden induzierten wir in diesen Tieren eine schwere fokale zerebrale Reperfusionischämie (60 Minuten MCAO), die einen ausgedehnten Infarkt erzeugte. Im Zeitverlauf von bis zu 14 Tagen wurde die Einwanderung von GFP-positiven Zellen, deren Ursprung im Knochenmark liegen musste, in das Infarktareal histologisch untersucht. Während vor dem experimentellen Schlaganfall und in der gesunden Hemisphäre nie GFP-positive Zellen gefunden wurden, zeigte sich im Infarkt ein deutliches Infiltrat GFP-positiver Zellen. Ein Teil dieser Zellen differenzierte dabei zu Mikroglia. Hierdurch war der Beweis erbracht, dass genetisch modifizierte Knochenmarkszellen in den Bereich eines akuten ZNS – Schadens migrieren können. Es kann spekuliert werden, dass eine andersartige Modifikation dieser Zellpopulation somit einen zelltherapeutischen Ansatz auch über eine intakte Blut-Hirn-Schranke hinweg liefern könnte (**Seite 45**).

2.2 Präkonditionierung - Induzierte Ischämietoleranz

Das Säugetiergehirn kann einer Ischämie nur wenige Minuten ohne Schaden standhalten (Spielmeier, 1926). Andererseits ist seit mehr als 40 Jahren bekannt, dass sich gegenüber einer Ischämie auch Toleranz induzieren lässt (Dahl und Balfour, 1964). Die Beschäftigung mit der experimentellen Induktion der Ischämietoleranz durch Präkonditionierung erfolgte für uns aus zwei Überlegungen: Zum einen wollten wir zugrunde liegende protektive Signalkaskaden, die Schutz vor Ischämie vermitteln können, verstehen. Außerdem interessierte uns eine mögliche Übertragung auf einen klinisch – therapeutischen Ansatz. Dieser wäre interessant, wenn bei bestimmten Patienten die Gefahr als hoch eingeschätzt werden muss, dass es aufgrund einer Erkrankung oder einer ärztlichen Maßnahme zu einer Hirnischämie kommen kann. Dieses Risiko besteht beispielsweise bei großen Herzoperationen (globale Perfusionsstörung während des Zirkulationsstillstandes) oder bei der Carotisthrombendarterektomie (fokale Perfusionsstörung durch arterio – arterielle Embolien). Derzeit wird bei Herzoperationen eine Hypothermie induziert, um so die mögliche Hypoxiezeit zu verlängern. Es wäre eine interessante Alternative, gelänge es, rechtzeitig im Gehirn der betroffenen Patienten eine Toleranz gegenüber einer Ischämie zu erzeugen.

Die Mechanismen der Toleranzinduktion bleiben nicht auf die Bedingungen der Hypoxie/Ischämie beschränkt. Viele biologisch schädliche Ereignisse können, wenn sie dicht unterhalb ihrer Schadensgrenze appliziert werden, endogene Schutzmechanismen induzieren (Dirnagl et al., 2003).

Janoff führte in diesem Zusammenhang bereits 1964 die Begriffe Toleranz und Präkonditionierung ein (Janoff, 1964).

Im Kontext des experimentellen Schlaganfalls ist der grundsätzliche experimentelle Ansatz bei allen Modellen ähnlich: Ein präkonditionierender Stimulus wird für eine definierte Zeit und Dosis zu einem bestimmten Zeitpunkt vor der eigentlichen Ischämie appliziert. Im günstigen Fall entsteht daraufhin Toleranz gegenüber der Ischämie.

Diese tritt in zwei gut definierten Zeitfenstern nach der Präkonditionierung auf:

Die „klassische Präkonditionierung“ im Intervall zwischen 5 und 120 Minuten öffnet ein frühes protektives Fenster. Der Begriff „klassisch“ bezieht sich dabei auf die historisch älteren Arbeiten am Herzen.

Die „verzögerte Präkonditionierung“ beginnt ungefähr 12 Stunden nach präkonditionierendem Stimulus, erzeugt die größte Toleranz zwischen 48 und 96 Stunden und lässt sich in einzelnen Modellen bis zu 7 Tage lang nachweisen (Dirnagl et al., 2003).

Viele Präkonditionierungsmodelle am Säugerhirn beschäftigen sich mit dem späteren Zeitfenster (zur Übersicht Weih et al., 2001), das Veränderungen der Genexpression aufweist und von der *de-novo* Proteinsynthese abhängig ist. Neben der ischämischen Präkonditionierung, bei der eine kurze sublethale Ischämie Toleranz vor einer nachfolgenden schweren Ischämie induziert, sind auch andere Präkonditionierungsmodelle charakterisiert worden. Jeweils nach der Art des präkonditionierenden Stimulus benannt, wurden beispielsweise Modelle der chemischen (Riepe et al., 1997), der inflammatorischen (Nawashiro et al., 1997; Bordet et al., 2000), der physikalischen (Ding et al., 2005) und der metabolischen (Zhan et al., 2002) Präkonditionierung beschrieben (zur Übersicht Weih et al., 2001; Dirnagl et al., 2003).

Diese Modelle haben zu unserem Verständnis protektiver Signalwege geführt, wie sie während der Präkonditionierung aktiviert werden.

Mechanistisch gehen wir heute von 3 Phasen der Präkonditionierung aus: Wichtige Vermittler der Toleranzinduktionsphase (vor allem NMDA-, K⁺-abhängige ATP- und Adenosinrezeptoren), der Transduktionsphase (Transkriptionsfaktoren wie HIF-1, *immediate early genes*, Proteinkinasen) und der Effektorphase (Expression der schützenden Proteine wie Hitzeschockproteine, BCL – Proteine, Radikalfänger) sind inzwischen bekannt (Weih et al., 2001; Dirnagl et al., 2003).

Wir bedurften zur Untersuchung endogen – protektiver Mechanismen zunächst eines robusten experimentellen Modells der Präkonditionierung.

2.2.1 *Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff*

Die Verwendung von hyperbarem Sauerstoff als physikalischem Präkonditionierungsstimulus hat wichtige Vorteile: Der applizierte Stimulus kann genau gemessen werden, die Präkonditionierung erfordert keinen invasiven Eingriff, die Übertragung des Modells auf andere Modellspezies und in die Zellkultur ist einfach und der präkonditionierende Stimulus ist different vom Schadensmodell.

Darüber hinaus ist die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff bereits in der Humanmedizin etabliert (Taucherkrankheit, Infektionen mit anaeroben Erregern), weshalb eine Übertragung des Prinzips auf die klinische Situation möglich erschien.

Dem Ansatz lag die Hypothese zugrunde, dass durch die Verwendung von hyperbarem Sauerstoff freie Sauerstoffradikale entstehen (Noda et al., 1983), die Ischämietoleranz über die Induktion antioxidativer Enzyme induzieren (zur Übersicht Schumann et al., 1999). Die prinzipielle Möglichkeit der Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff wurde bereits von Wada in einem Modell der globalen Hypoxie gezeigt (Wada et al., 1996).

Wir untersuchten unterschiedliche Paradigmen der hyperbaren Sauerstoffapplikation. Durch die Gabe von hyperbarem Sauerstoff (3 atm) für eine Stunde an fünf aufeinander folgenden Tagen gelang es uns, Toleranz gegenüber einer permanenten fokalen zerebralen Ischämie zu erzeugen, so dass die entstehenden Infarkt volumen in der präkonditionierten Gruppe 27% kleiner waren als in der Kontrollgruppe (**Seite 36**).

Dieses technisch simple Modell erwies sich jedoch als problematisch, weshalb wir diesen Ansatz nicht weiter verfolgen konnten. Die Präkonditionierung gelang nur in einem der untersuchten Mausstämme und war begrenzt auf eine permanente MCAO (**Seite 37**). Für weitere Untersuchungen war dieses Modell somit ungeeignet.

2.2.2 HIF-1 abhängige Präkonditionierung

Im Zentrum der Adaptation einer Zelle an hypoxische Umgebungsbedingungen steht der Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie – induzierbarer Faktor 1), der als „universeller Hauptschalter“ fungiert (zur Übersicht Semenza 2000). Seine Zielgene führen zur Anpassung des Glucosestoffwechsels und -transports, regulieren die vaskuläre Biologie und greifen in den Eisenstoffwechsel und die Erythropoese ein.

Für uns war vor allem das Zielgen /-protein Erythropoietin (EPO) von Interesse. EPO kann im Gehirn gebildet werden (Masuda et al., 1994; Marti et al., 1996) und sein Rezeptor wurde im Gehirn nachgewiesen (Digicaylioglu et al., 1995; Morishita et al., 1997). Es wirkt über einen parakrinen neuroprotektiven Mechanismus an Neuronen (Bernaudin et al., 1999; Sakanaka et al., 1998; Brines et al., 2000).

Der wahrscheinlichste Mechanismus der EPO – vermittelten Neuroprotektion dürfte dabei seine antiapoptotische Potenz sein, die es über mehrere Kaskaden vermittelt. Daran sind neben der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K), die Proteinkinase B (Akt), der *Bcl-2-Antagonist of Cell Death* (BAD) auch die Janus – Kinase 2 (JAK2) und der Transkriptionsfaktor NF- κ B beteiligt (Ruscher et al., 2002).

Die zentrale Hypothese unserer Experimente war, dass es möglich ist, experimentell die Induktion von HIF-1 zu verstärken, was zur Synthese seines Zielproteins EPO führt, das über den beschriebenen Signalweg Ischämietoleranz vermittelt.

Wir etablierten Präkonditionierungsmodelle mit zwei bereits beschriebenen HIF-1 Induktoren: Hypoxie (Wang und Semenza, 1993a) und Desferrioxamin (DFX) (Wang und Semenza, 1993b). DFX ist als Medikament zur Behandlung einer Eisenüberladung in Verwendung, weshalb sich diese Substanz zur pharmakologischen Präkonditionierung anbot. Die Möglichkeit der Präkonditionierung durch eine vorausgehende Hypoxie war zumindest in einem Modell der neonatalen zerebralen Ischämie beschrieben worden (Sharp et al.,

2004). Mit beiden Ansätzen gelang es uns, dosisabhängig Ischämietoleranz im Mausmodell des experimentellen Schlaganfalls zu induzieren (**Seiten 50, 70**).

Die Modelle erwiesen sich als ausreichend stabil, um sie für mechanistische Untersuchungen einsetzen zu können (Zusammenarbeit mit Dr. Karsten Ruscher und Prof. Dr. Andreas Meisel, Klinik für Neurologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin). In beiden Paradigmen konnten wir eine vermehrte HIF-1 DNA-Bindung messen (**Seiten 50, 71**). Mittels *real-time* RT-PCR gelang uns der Nachweis einer EPO – Induktionskinetik: Nach DFX – Präkonditionierung liegt ihr Maximum zweigipflig zwischen 4 und 24 Stunden (**Seite 50**), nach hypoxischer Präkonditionierung zeigt sich ihr Maximum (6-facher Anstieg gegenüber Ausgangsniveau) 1 Stunde nach Hypoxie (**Seite 71**). Mit einem Immunoassay auf Cortexneuronen (Zusammenarbeit mit Dr. Dirk Megow, Klinik für Neurologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) von zuvor hypoxisch präkonditionierten Mäusen konnten wir auch den Anstieg des EPO – Proteins bereits 1 Stunde nach Hypoxie nachweisen (**Seite 70**). Im Gegensatz zum Gen war das Protein noch nach 48 Stunden deutlich erhöht nachweisbar. Eine toleranzvermittelnde Funktion des EPO in diesem Modell schien also plausibel. Den experimentellen Beweis dafür erbrachten wir durch ein pharmakologisches Inhibitionsexperiment, bei dem wir nach der präkonditionierenden Hypoxie löslichen EPO – Rezeptor intrazerebroventrikulär in das Mausgehirn infundierten. Hierdurch wurde der präkonditionierende Effekt der hypoxischen Vorbehandlung teilweise aufgehoben (**Seite 71**), was die Beteiligung des EPO an der Ischämietoleranz belegt.

2.3 Schlaganfall - induzierte Immundepression

Der Verlauf und die Prognose des klinischen Schlaganfalls werden wesentlich durch medizinische Komplikationen beeinflusst (Davenport et al., 1996; Johnston et al., 1998). Mehr als 85% aller Schlaganfallpatienten erleiden im Verlauf ihrer Erkrankung eine relevante Komplikation (Langhorne et al., 2000). Infektionen, vor allem Harnwegs- und Atemwegsinfekte, gehören zu den Häufigsten, sowohl in der Akutphase als auch noch während der Rehabilitation (zur Übersicht Chamorro et al. 2006; Kalra et al, 1995). In der Literatur wird die Inzidenz von Infektionen bei Schlaganfallpatienten mit 21 bis 65% angegeben (zur Übersicht Meisel et al. 2005).

Die Schlaganfall – assoziierte Pneumonie (SAP) ist von herausgehobener Bedeutung (Hilker et al., 2003). Sie tritt in einer Häufigkeit von bis zu 32% auf (Perry und Love, 2001) und ist neben der Herniation eines raumfordernden Infarktes die Haupttodesursache nach Schlaganfall. Eine registerbasierte Untersuchung errechnet für die SAP das höchste attributive Sterblichkeitsrisiko mit 30% (Heuschmann et al., 2004).

Wir spekulierten eine besondere Empfindlichkeit des Schlaganfallpatienten für Infektionen. Diese Annahme ist nicht neu. Bereits 1836 formulierte Hufeland:

„Bei der vollständigen Apoplexie ist der Verlauf folgender:
Entweder der Kranke kommt gar nicht wieder zu sich,
sondern stirbt daran, oder er kommt wieder zur Besinnung,
und nun tritt Fieber ein, gewöhnlich *remittens* mit täglichen
Exacerbationen, welches entweder den Kranken durch
Koktion und Krisis rettet (den 7. oder 14. Tag), oder in einer
Exacerbation, gewöhnlich am 3. oder 7. Tage, einen neuen
Anfall der Apoplexie herbeiführt und ich tödtet.“ (Hufeland,
1836).

Aber wie können die häufigen Infektionen bei Schlaganfallpatienten erklärt werden?

Bettlägerigkeit, eine Dysphagieinzidenz von bis zu 70% (Shigemitsu und Afshar, 2007) und eine Beeinträchtigung des Bewusstseins und der Schutzreflexe führen zu einem erheblichen Aspirationsrisiko. Die Aspiration von oropharyngealem Sekret ist ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung von Pneumonien (Perry und Love, 2001).

Dennoch gilt es heute als akzeptiert, dass Aspirationen die hohe Inzidenz der SAP nicht allein erklären können (Perry und Love, 2001; Marik, 2001):

- 1) SAP sind deutlich seltener als Schluckstörungen,
- 2) Aspirationen sind häufig aber nicht zuverlässig mit Pneumonien assoziiert (Smithard et al., 1996),
- 3) SAP treten auch ohne Dysphagie auf (Aviv et al., 1997) und
- 4) fast jeder zweite Gesunde aspiriert nachts relevante Mengen Sekret ohne daraufhin eine Pneumonie zu erleiden (Huxley et al., 1978).

Wir stellten deshalb die Hypothese auf, dass es beim Schlaganfallpatienten zu einer bestimmten Prädisposition kommen muss, die durch den Schlaganfall moduliert wird und dann zur hohen Empfindlichkeit gegenüber Infektionen führt. Wir postulierten ein Schlaganfall – induziertes Immundepressionssyndrom (SIDS).

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Dr. Christian Meisel (Institut für Immunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) und Herrn Prof. Dr. Andreas Meisel (Klinik für Neurologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) unternahmen wir eine immunologische Charakterisierung von Mäusen nach einem Schlaganfall um ein SIDS nachzuweisen. Mittels Durchflusszytometrie (FACS) konnten wir zeigen, dass es nach einem experimentellen Schlaganfall zu einer schweren Leukopenie im Blut und in lymphatischen Organen wie Milz und Thymus kommt

(Seite 58). Im Vergleich zu Sham – operierten Kontrolltieren fanden wir bei Mäusen nach MCAO eine schwere Lymphopenie (Reduktion der Zellzahl um bis zu 90%), die schon nach 12 Stunden nachweisbar war und bei einigen Zellpopulationen (wie B- und NK-Zellen) mindestens 7 Wochen anhielt. Ursächlich für die verminderte Zellularität war eine deutlich vermehrte Apoptoserate, die wir in der Milz und im Thymus zeigen konnten (Seiten 59, 86). *In vitro* gelang außerdem der Nachweis einer Funktionsstörung der verbleibenden Zellpopulationen. In Stimulationstests mit Endotoxin und Concanavalin A zeigten die Zellkulturen aus Mäusen nach MCAO eine verminderte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ und einen Anstieg der IL-4 Produktion (Seite 58). Neben der schon erwähnten Lymphopenie kam es also auch zu einem funktionellen Th1/Th2-Shift der verbleibenden Lymphozytenpopulationen.

Die immunologischen Beeinträchtigungen nach experimentellem Schlaganfall waren so ausgeprägt, dass die Tiere nach MCAO spontan eine schwere septische Pneumonie mit hoher Sterblichkeit erlitten (Seiten 57, 61).

Wie könnte ein Schlaganfall zu einer Störung des Immunsystems führen?

Die beiden „Supersysteme“ ZNS und Immunsystem dienen der Anpassung des Organismus an die Umwelt. Beide sind eng miteinander verbunden und kommunizieren über mehrere Wege (zur Übersicht Meisel et al., 2005; Chamorro et al., 2007).

Drei Schnittstellen zwischen ihnen sind im Zusammenhang akuter ZNS – Läsionen charakterisiert worden: die beiden Stresssysteme (sympathisches Nervensystem (SNS) und das Hypothalamus – Hypophysen – Nebennierensystem (HHNN)) sowie das cholinerg – vagale System. Die Aktivierung der Stresssysteme ist nach einem Schlaganfall bekannt (Fassbender et al., 1994; Chamorro et al. 2007).

Die differente Beteiligung der beiden Stresssysteme (SNS und HHNN) am entstehenden SIDS konnten wir mit pharmakologischen Inhibitionsexperimenten nachweisen. Die Apoptose in lymphatischen Organen und die

Monozytenfunktionsstörung kann über beide Achsen nach einem Schlaganfall vermittelt werden (**Seiten 59, 60**), jedoch vermittelt nur das SNS die Lymphozytenfunktionsstörung (**Seite 59**), die wiederum wesentlich für die Entstehung der Infektionen ist. Im Umkehrschluss lässt sich folgern, dass eine MCAO zu einer Aktivierung des SNS führt, welches das SIDS auslöst und zur erhöhten Suszeptibilität gegenüber Infektionen führt.

Der Vergleich der MCAO – Gruppen gegen Sham – operierte Kontrolltiere schließt dabei aus, dass die beobachteten Veränderungen nur auf die experimentelle Präparation zurückzuführen sind. Die Präparation war bei beiden Gruppen gleich, der okkludierende Faden wurde bei beiden Gruppen bis zum Abgang der ACM vorgeschoben, in der Sham – Gruppe aber sofort wieder um 2 mm zurückgezogen, wodurch es zu keiner Ischämie im ACM – Territorium kam.

Dem SIDS vergleichbare immunologische Beeinträchtigungen wurden auch nach traumatischer Hirnschädigung (Woiciechowsky et al., 1998) und nach Rückenmarkstrauma (DeVivo et al., 1993) beschrieben. Wir fassten sie deshalb gemeinsam mit unseren Befunden unter dem Begriff „*central nervous system injury induced immunodeficiency syndrome*“ (CIDS) zusammen (zur Übersicht Meisel et al., 2005).

Die kausale Bedeutung des CIDS für die entstehenden Infektionen konnten wir durch mehrere Experimente belegen:

- 1) Durch pharmakologische SNS – Blockade nach MCAO kommt es zur Aufhebung des CIDS. Dosisabhängig reduziert sich die Schwere der Infektionen. Die Sterblichkeit nach MCAO sinkt. (**Seite 61**).
- 2) Mittels adoptivem Transfer von Lymphozyten aus gesunden Spendertieren in Tiere nach MCAO konnten wir die Lymphopenie und die lymphozytäre Funktionsstörung teilweise ausgleichen. Die in Blut und Lunge gefundenen Keimzahlen reduzierten sich erheblich (**Seite 62**).
- 3) Die IFN- γ Sekretionsstörung ist in unserem CIDS – Modell ein zentraler Befund. Durch Gabe dieses Zytokins nach dem Schlaganfall, lässt sich die

Schwere der auftretenden Infektionen reduzieren. Dementsprechend führte auch nur der adoptive Lymphozytentransfer mit Kulturen aus gesunden Wildtypmäusen zu einer Reduktion der Keimzahlen in Blut und Lunge. Ein Transfer mit Zellen von IFN- γ Knockout – Mäusen führte zu keiner Änderung der Infektionsschwere (**Seite 62**)

- 4) Nach Gabe des Caspaseinhibitors N-(2Quinoly)valyl-aspartyl 2,6-difluorophenoxymethylketon reduzierte sich die Apoptoserate in lymphatischen Organen nach experimentellem Schlaganfall (**Seite 87**) (Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Johann Braun, Klinik für Neurologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin). In der Folge kam es zu weniger schweren Infektionen. Insbesondere die Bakteriämie war weniger stark ausgeprägt (**Seite 88**)

Da wir die experimentellen Ergebnisse zum CIDS und zur SAP auch auf die Situation des Schlaganfallpatienten für übertragbar hielten, begannen wir mit der Planung einer klinischen Studie, die die Effektivität einer präventiven antiinfektiven Therapie (PAT) untersuchen sollte. Dazu testeten wir zuvor diesen Ansatz noch im Tierexperiment. Eine PAT über 12 Stunden, sofort oder mit 12 Stunden Latenz zum experimentellen Schlaganfall begonnen, war im Mausmodell im Stande, das Auftreten von Infektionen zu verhindern, reduzierte die Sterblichkeit und das Schlaganfallvolumen und besserte das neurologische Defizit im Vergleich zu einer Vektorbehandlung (**Seiten 77, 78**).

3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der tierexperimentellen Schlaganfallforschung haben in den letzten Jahren wesentlich zu unserem Verständnis der Pathophysiologie dieser wichtigen Volkskrankheit beigetragen. Sie haben darüber hinaus sogar zur Formulierung von Therapieempfehlungen geführt.

Da die Untersuchungen *in vivo* in einem biologischen Gesamtsystem erfolgen, sind sie nicht auf das Gehirn beschränkt, wie bei Zellkulturexperimenten oder Hirn – Slice – Modellen, sondern erlauben ein Studium des Gesamtorganismus, seiner gesamten Physiologie und aller möglicherweise beteiligten Gewebe. Außerdem ist der Einsatz eines weiten methodischen Spektrums - angefangen von der Bildgebung, der Histologie, über mikrobiologische, biochemische und molekulargenetische Techniken - möglich.

In den hier zusammengefassten Arbeiten haben wir uns mit drei klinisch relevanten Fragestellungen beschäftigt:

1. Wir konnten zeigen, dass es nach einem experimentellen Schlaganfall zur Einwanderung von endogenen Knochenmarkzellen kommt. In unserem Modell erfolgte die Migration der genetisch veränderten Zellen exklusiv in das Infarktareal.
2. Durch pharmakologisch oder hypoxisch getriggerte HIF-1 Induktion vor einem Schlaganfall lässt sich eine robuste Toleranz vor einer fokalen zerebralen Ischämie induzieren.
3. Nach einem Schlaganfall kommt es zu einem schweren CIDS. Das CIDS ist kausal verantwortlich für die nach einem Schlaganfall häufig auftretenden und prognosebestimmenden Pneumonien (SAP). Im Experiment führt die immunologische Rekonstitution auch zur Senkung der Infektionsinzidenz.

Diese Arbeiten führten uns zu pathophysiologisch relevanten Befunden: Wir konnten das Migrationsverhalten und die -kinetik der Knochenmarkszellen beschreiben und nachweisen, dass es auch zur weiteren Differenzierung der eingewanderten Zellen kommen kann (Mikroglia).

Die Präkonditionierungsmodelle erlaubten uns die Untersuchung induzierbarer, endogener, protektiver Signalwege. Die vermehrte DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors HIF-1 nach Präkonditionierung führt zur EPO-Synthese im Gehirn. Wir konnten *in vivo* im erwachsenen Säugergehirn die protektive Potenz von endogen gebildetem EPO belegen.

Wir konnten detailliert die CIDS – Mechanismen beschreiben: Ausgehend von einer Aktivierung des SNS nach einem Schlaganfall kommt es zu einer früh einsetzenden und lang anhaltenden Lymphopenie. Verbleibende Zellpopulationen sind funktionell gestört, insbesondere die verminderte IFN- γ Sekretion der Lymphozyten ist in unserem Modell relevant.

In unterschiedlichem Ausmaß lässt sich heute auch schon die Relevanz unserer Ergebnisse für den humanen Schlaganfall vermuten. Die Einwanderung von genetisch veränderten Knochenmarkszellen eröffnet das Prinzip einer schlaganfallspezifischen Zelltherapie, wenn es gelingt therapierelevante Modifikationen an den migrierenden Zellen durchzuführen. Eine derartige Therapie wäre auch imstande, die Bluthirnschranke zu überwinden.

Bestimmte Patientengruppen unterliegen für einen kurzen Zeitraum einem hohen Risiko für Schlaganfälle (bspw. Herzoperationen, Carotisoperationen). Eine ischämische Präkonditionierung könnte die Folgen eines Schlaganfalles lindern. Hoffnung machen klinische Arbeiten, die es wahrscheinlich erscheinen lassen, dass sich das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung auch beim Menschen finden lässt (Weih et al., 1999; Moncayo et al., 2000; Wegener et al., 2004). Es kann also spekuliert werden, dass experimentelle Befunde der Präkonditionierung zukünftig klinisch genutzt werden können. Das von uns charakterisierte Modell einer Präkonditionierung mit dem Arzneimittel DFX wäre einer klinischen Prüfung zugänglich.

Während die Ergebnisse unserer klinischen Studie (PANTHERIS - ISRCTN Register <http://www.controlled-trials.com/isrctn/trial/%7C/0/74386719.html>) noch nicht veröffentlicht worden sind, gelang es bereits anderen Arbeitsgruppen überzeugende Hinweise für die Existenz eines SIDS beim Schlaganfallpatienten nachzuweisen. In Übereinstimmung mit unseren tierexperimentellen Befunden werden Schlaganfall – induzierte Veränderungen der Zytokinspiegel (IL6, IL10, TNF- α), der Zellularität des peripheren Blutes und die frühe Aktivierung des SNS (Chamorro et al., 2006; Chamorro et al., 2007) berichtet. Ein individuelles Komplikationsmanagement und die frühe Erkennung und Behandlung von Infektionen sind heute schon zentral im Schlaganfallkonzept verankert. Ob die PAT bei Hochrisikopatienten eine sinnvolle Therapieoption zur Verhinderung der prognosebestimmenden SAP werden kann, werden die laufenden klinischen Studien schon bald klären können. Möglicherweise wird es auch gelingen einige immunrekonstitutive Ansätze aus dem Experiment ins Krankenbett zu transferieren.

Wichtig bleibt die Bestätigung experimenteller Daten in geeigneten klinischen Studien, was für zentrale experimentelle Befunde bisher nicht gelang oder noch aussteht (Dirnagl, 2006). Die zugrunde liegenden Probleme sind vielfältig, erfassen relevante Speziesunterschiede und den erheblichen Aufwand klinischer Studien genauso wie qualitative Unzulänglichkeiten.

Dennoch bleibt die experimentelle Schlaganfallforschung *in vivo* ein wichtiges, unverzichtbares wissenschaftliches Instrument des Erkenntnisgewinns.

Literaturverzeichnis

1. **Aleu A, Mellado P, Lichy C, Köhrmann M, Schellinger PD.** Hemorrhagic complications after off-label thrombolysis for ischemic stroke. *Stroke*. 2007 Feb;38(2):417-22.
2. **Aviv JE, Sacco RL, Thomson J, Tandon R, Diamond B, Martin JH, Close LG.** Silent laryngopharyngeal sensory deficits after stroke. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1997 Feb;106(2):87-93.
3. **Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E.** A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:643–651.
4. **Bordet R, Deplanque D, Maboudou P, Puisieux F, Pu Q, Robin E, Martin A, Bastide M, Leys D, Lhermitte M, Dupuis B.** Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000 Aug;20(8):1190-6.
5. **Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A.** Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:10526–10531.
6. **Chamorro A, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera A, Torres F, Planas AM.** Interleukin 10, monocytes and increased risk of early infection in ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006 Nov;77(11):1279-81.
7. **Chamorro A, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera A, Gómez-Choco M, Torres F, Planas AM.** Catecholamines, infection, and death in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 2007 Jan 15;252(1):29-35.
8. **Chamorro A, Urra X, Planas AM.** Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke*. 2007 Mar;38(3):1097-103.

9. **Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M.** Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci.* 2001 Aug 15;189(1-2):49-57.
10. **Dahl NA, Balfour WM.** Prolonged anoxic survival due to anoxia preexposure: brain ATP, lactate, and pyruvate. *Am. J. Physiol.* 1964 Aug;207:452-6.
11. **Davenport RJ, Dennis MS, Wellwood I, Warlow CP.** Complications after acute stroke. *Stroke.* 1996 Mar;27(3):415-20.
12. **DeVivo MJ, Black KJ, Stover SL.** Causes of death during the first 12 years after spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 1993 Mar;74(3):248-54.
13. **Díez-Tejedor E, Fuentes B.** Acute care in stroke: do stroke units make the difference? *Cerebrovasc Dis.* 2001;11 Suppl 1:31-9.
14. **Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M.** Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:3717–3720.
15. **Ding YH, Young CN, Luan X, Li J, Rafols JA, Clark JC, McAllister JP 2nd, Ding Y.** Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. *Acta Neuropathol (Berl).* 2005 Mar;109(3):237-46.
16. **Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA.** Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999 Sep;22(9):391-7.
17. **Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM.** Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 2003 May;26(5):248-54.
18. **Dirnagl U.** Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 Dec;26(12):1465-78.
19. **Durukan A, Tatlisumak T.** Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007 May;87(1):179-97.
20. **Fassbender K, Schmidt R, Mossner R, Daffertshofer M, Hennerici M.** Pattern of activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in acute

stroke. Relation to acute confusional state, extent of brain damage, and clinical outcome. *Stroke* 1994 Jun;25(6):1105-8

21. **Fuentes B, Díez-Tejedor E, Ortega-Casarrubios MA, Martínez P, Lara M, Frank A.** Consistency of the benefits of stroke units over years of operation: an 8-year effectiveness analysis. *Cerebrovasc Dis.* 2006;21(3):173-9.
22. **Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA.** Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 Jul;16(4):605-11.
23. **Harms H, Prass K, Dirnagl U, Meisel A.** Therapierrelevante Pathophysiologie des akuten ischämischen Schlaganfalls: Was ist gesichert? *Akt Neurol* 2004; 31: 113-121
24. **Heuschmann PU, Kolominsky-Rabas PL, Misselwitz B, Hermanek P, Leffmann C, Janzen RW, Rother J, Buecker-Nott HJ, Berger K; German Stroke Registers Study Group.** Predictors of in-hospital mortality and attributable risks of death after ischemic stroke: the German Stroke Registers Study Group. *Arch Intern Med.* 2004 Sep 13;164(16):1761-8.
25. **Hilker R, Poetter C, Findeisen N, Sobesky J, Jacobs A, Neveling M, Heiss WD.** Nosocomial pneumonia after acute stroke: implications for neurological intensive care medicine. *Stroke.* 2003 Apr;34(4):975-81.
26. **Hufeland CW.** *Enchiridion medicum oder Anleitung zur medizinischen Praxis Vermächtnis einer fünfzigjährigen Erfahrung* 1. Auflage, Jonas Verlagsbuchhandlung, Bln, 1836.
27. **Huxley EJ, Viroslav J, Gray WR, Pierce AK.** Pharyngeal aspiration in normal adults and patients with depressed consciousness. *Am J Med.* 1978 Apr;64(4):564-8.
28. **Janoff A.** Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock; effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. *Int Anesthesiol Clin.* 1964 Feb;2:251-69.

29. **Johnston KC, Li JY, Lyden PD, Hanson SK, Feasby TE, Adams RJ, Faught RE Jr, Haley EC Jr.** Medical and neurological complications of ischemic stroke: experience from the RANTTAS trial. RANTTAS Investigators. *Stroke*. 1998 Feb;29(2):447-53.
30. **Kalra L, Yu G, Wilson K, Roots P.** Medical complications during stroke rehabilitation. *Stroke*. 1995 Jun;26(6):990-4.
31. **Klijn CJ, Hankey GJ; American Stroke Association and European Stroke Initiative.** Management of acute ischaemic stroke: new guidelines from the American Stroke Association and European Stroke Initiative. *Lancet Neurol*. 2003 Nov;2(11):698-701.
32. **Kolominsky – Rabas P.** Schlaganfall in Deutschland. Anhaltszahlen zum Schlaganfall aus dem bevölkerungsbasierten Erlanger Schlaganfallregister im Rahmen der Gesundheitsberichtserstattung GBE des Bundes. http://www.dsg-info.de/pdf/Anhaltszahlen_zum_Schlaganfall.pdf. 2004
33. **Külkens S, Ringleb PA, Hacke W.** Empfehlungen der European Stroke Initiative (EUSI) zur Behandlung des ischämischen Schlaganfalls — Aktualisierung 2003 *Nervenarzt*. 2004 Apr;75(4):368-79
34. **Langhorne P, Stott DJ, Robertson L, MacDonald J, Jones L, McAlpine C, Dick F, Taylor GS, Murray G.** Medical complications after stroke: a multicenter study. *Stroke*. 2000 Jun;31(6):1223-9.
35. **Leys D, Ringelstein EB, Kaste M, Hacke W.** The main components of stroke unit care: results of a European expert survey. *Cerebrovasc Dis*. 2007;23(5-6):344-52.
36. **Marik PE.** Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia. *N Engl J Med*. 2001 Mar 1;344(9):665-71.
37. **Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M.** Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci*. 1996;8:666–676.
38. **Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R.** A novel site of erythropoietin production: oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem*. 1994;269:19488–19493.

- 39. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U.** Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Oct;6(10):775-86.
- 40. Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A.** Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis.* 2004 Dec;19(3-4):151-67.
- 41. Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, Altieri M, van Melle G.** Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology.* 2000 Jun 13;54(11):2089-94.
- 42. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R.** Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience.* 1997;76:105–116.
- 43. Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, Hallenbeck JM.** TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997 May;17(5):483-90.
- 44. Neal JW, Singhrao SK, Jasani B, Newman GR.** Immunocytochemically detectable metallothionein is expressed by astrocytes in the ischaemic human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1996 Jun;22(3):243-7.
- 45. Noda Y, McGeer PL, McGeer EG.** Lipid peroxide distribution in brain and the effect of hyperbaric oxygen. *J Neurochem.* 1983 May;40(5):1329-32.
- 46. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P.** Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10344-9.
- 47. Perry L, Love CP.** Screening for dysphagia and aspiration in acute stroke: a systematic review. *Dysphagia.* 2001 Winter;16(1):7-18.
- 48. Riepe MW, Esclaire F, Kasischke K, Schreiber S, Nakase H, Kempfski O, Ludolph AC, Dirnagl U, Hugon J.** Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "chemical preconditioning". *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997 Mar;17(3):257-64.

- 49. 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 Dec 1;22(23):10291-301.
- 50. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R.** In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:4635–4640.
- 51. Schumann P, Prass K, Wiegand F, Ahrens M, Megow D, Dirnagl U.** Oxygen free radicals and ischemic preconditioning in the brain: Preliminary data and a hypothesis. In: U. Ito, C. Fieschi, F. Orzi, T. Kuroiwa, I. Klatzo (Eds.), *Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia III*, Springer, Heidelberg, New York, 1999, pp.95-103.
- 52. Semenza GL.** HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol.* 2000 Apr;88(4):1474-80.
- 53. Sharp FR, Ran R, Lu A, Tang Y, Strauss KI, Glass T, Ardizzone T, Bernaudin M.** Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx.* 2004 Jan;1(1):26-35.
- 54. Shigemitsu H, Afshar K.** Aspiration pneumonias: under-diagnosed and under-treated. *Curr Opin Pulm Med.* 2007 May;13(3):192-8.
- 55. Smithard DG, O'Neill PA, Parks C, Morris J.** Complications and outcome after acute stroke. Does dysphagia matter? *Stroke.* 1996 Jul;27(7):1200-4.
- 56. Spielmeier W.** Zur Pathogenese örtlich elektiver Gehirnveränderungen. *Z Neurol Psychiatr.* 1926;99:756–777.
- 57. Wada K, Ito M, Miyazawa T, Katoh H, Nawashiro H, Shima K, Chigasaki H.** Repeated hyperbaric oxygen induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus. *Brain Res.* 1996 Nov 18;740(1-2):15-20.
- 58. Wang GL, Semenza GL.** General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 May 1;90(9):4304-8.
- 59. Wang GL, Semenza GL.** Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity:

implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*. 1993 Dec 15;82(12):3610-5.

60. **Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, Knab R, Fiebach JB, Schellinger PD, Kucinski T, Jungehülsing GJ, Brunecker P, Müller B, Banasik A, Amberger N, Wernecke KD, Siebler M, Röther J, Villringer A, Weih M; MRI in Acute Stroke Study Group of the German Competence Network Stroke.** Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke*. 2004 Mar;35(3):616-21.
61. **Weih M, Kallenberg K, Bergk A, Dirnagl U, Harms L, Wernecke KD, Einhäupl KM.** Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke*. 1999 Sep;30(9):1851-4.
62. **Weih M, Prass K, Ruscher K, Trendelenburg G, Dirnagl U, Riepe MW, Meisel A.** Ischämietoleranz Modell für die Forschung, Hoffnung für die Klinik? *Nervenarzt*. 2001 Apr;72(4):255-60.
63. **Weimar C, Ringelstein EB, Diener HC.** Monitoring stroke units Organisation, Ergebnisse, Wirtschaftlichkeit. *Nervenarzt*. 2007 Aug;78(8):957-966.
64. **Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schöning B, Glöckner F, Lanksch WR, Volk HD, Döcke WD.** Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):808-13.
65. **Zhan RZ, Fujihara H, Baba H, Yamakura T, Shimoji K.** Ischemic preconditioning is capable of inducing mitochondrial tolerance in the rat brain. *Anesthesiology*. 2002 Oct;97(4):896-901.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Karl Max Einhüpl danke ich für seine Förderung, seine Unterstützung und die Gewährung der vielen Freiräume.

Herrn Professor Dirnagl, der meine Begeisterung für die experimentelle Forschung geweckt hat, mich rasch zum selbständigen Arbeiten führte, meinen wissenschaftlichen Problemen immer zugänglich war und meine Fähigkeiten zur logischen Beweisführung und wissenschaftlichen Argumentation mit entwickelt hat, möchte ich besonders danken.

Meinem zweiten wissenschaftlichen Lehrer und Freund, Professor Dr. Andreas Meisel: für das „Querdenken“, die vielen Diskussionen und die stete Ermunterung kreativ zu arbeiten.

Meinem klinischen Lehrer, Dr. Rolf Zschenderlein, danke ich, für den „Brückenschlag“ zwischen experimenteller Forschung und klinisch – akademischer Medizin und vor allem weil er mir half, mich vom begeisterten Studenten zum Arzt und Neurologen zu entwickeln.

Meinen Freunden und Kollegen im Labor und in der Klinik gebührt mein Dank genauso, allen voran Prof. Dr. Josef Priller, Dr. Dirk Megow, Prof. Dr. Johann Braun, Dr. Hendrik Harms, Dr. Anna Georgi, Sabine Cho und Prof. Dr. Jörg Weber. Außerdem dem Team des Labors für die freundliche Aufnahme und das kreative Klima. Für die erfolgreiche wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanke ich mich bei Dr. Karsten Ruscher und Dr. George Trendelenburg.

Für die zuverlässige Unterstützung danke ich Frau PD Dr. Ute Lindauer.

Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

Prass K, Wiegand F, Schumann P, Ahrens M, Kapinya K, Harms C, Liao W, Trendelenburg G, Gertz K, Moskowitz MA, Knapp F, Victorov IV, Megow D, Dirnagl U. Hyperbaric oxygenation induced tolerance against focal cerebral ischemia in mice is strain dependent. *Brain Res.* 2000 Jul 14;871(1):146-50.

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Etablierung eines Präkonditionierungsmodells an zwei Mausstämmen (SV129 und C57BL/6) mittels hyperbarem Sauerstoff (HBO). Dazu wurden unterschiedliche Paradigmen der Sauerstoffapplikation getestet. Durch HBO konnte in SV 129 – Mäusen Toleranz vor einer permanenten fokalen Ischämie erzeugt werden, nicht jedoch vor einer Reperfusionischämie. Ebenso gelang dies nicht bei Mäusen des anderen getesteten Stammes (C57BL/6).

Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, **Prass K**, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med.* 2001 Dec;7(12):1356-61.

Zusammenfassung

Die Blut-Hirn-Schranke beeinträchtigt das Eindringen von Blutzellen in das ZNS, wodurch auch gentherapeutische Ansätze erschwert werden. In dieser Arbeit beschreiben wir, dass genetisch modifizierte Knochenmarkszellen im Stande sind in das ZNS einzudringen und dort weiter differenzieren können. Sie könnten somit als Vektor für eine Gentherapie dienen.

Prass K, Ruscher K, Karsch M, Isaev N, Megow D, Priller J, Scharff A, Dirnagl U, Meisel A. Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 May;22(5):520-5.

Zusammenfassung

Desferrioxamin (DFX) ist eine Substanz, die in der Humanmedizin als Medikament zur Behandlung einer Eisenüberladung eingesetzt wird. Sie ist ein potenter Induktor des Transkriptionsfaktors HIF-1, der die Zelle an hypoxische Bedingungen adaptiert. Wir charakterisierten ein Modell der ischämischen Präkonditionierung, bei dem vor einer fokalen zerebralen Ischämie Ratten oder Mäusen DFX gegeben wurde. Wir fanden eine dosisabhängige Toleranzinduktion vor einem experimentellen Schlaganfall und vor Sauerstoff – Glukose – Entzug im Zellkulturexperiment. In unserem Modell konnten wir die Kinetik der HIF-1 Induktion und die Expression des HIF-1 Zielgens EPO beschreiben.

Prass K*, Meisel C*, Hoflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med.* 2003 Sep 1;198(5):725-36.

(* äquivalenter Beitrag der Autoren)

Zusammenfassung

In einem Modell der fokalen zerebralen Ischämie der Maus charakterisierten wir ein Schlaganfall – induziertes Immundepressionssyndrom (SIDS), das zu vermehrten bakteriellen Infektionen führt: Mit pharmakologischen Inhibitionsexperimenten zeigten wir die Bedeutung des sympathischen Nervensystems für die SIDS – Entstehung. Wir fanden eine früh einsetzende Lymphopenie und ein verändertes Muster der Zytokinproduktion der T-Helferzellen (Th1 zu Th2 – Shift) nach einem experimentellen Schlaganfall. Durch adoptiven Zelltransfer gelang uns der Nachweis der beeinträchtigten IFN- γ - Produktion.

Prass K, Scharff A, Ruscher K, Lowl D, Muselmann C, Victorov I, Kapinya K, Dirnagl U, Meisel A. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke*. 2003 Aug;34(8):1981-6.

Zusammenfassung

Wir testeten die Hypothese, dass endogen gebildetes EPO ein wirksamer Vermittler einer Toleranz vor fokaler zerebraler Ischämie sein kann.

Wir etablierten dazu ein Modell der ischämischen Präkonditionierung indem wir unterschiedliche Hypoxieparadigmen in verschiedenen experimentellen Schlaganfallmodellen untersuchten. Wir wiesen die vermehrte HIF-1 DNA – Bindung und die Expression von EPO in diesem Modell nach. Durch intrazerebroventrikuläre Gabe von löslichem EPO – Rezeptor konnten wir die Schutzwirkung unseres Präkonditionierungsmodells reduzieren und die Beteiligung von EPO an der Toleranz beweisen.

Meisel C*, **Prass K***, Braun J, Victorov I, Wolf T, Megow D, Halle E, Volk HD, Dirnagl U, Meisel A. Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. *Stroke*. 2004 Jan;35(1):2-6.

(* äquivalenter Beitrag der Autoren)

Zusammenfassung

Nach experimentellem Schlaganfall kommt es zur Entstehung eines Schlaganfall – induzierten Immundepressionssyndroms und in dessen Folge zu schweren bakteriellen Infektionen. Wir untersuchten hier die Hypothese, dass eine präventive antiinfektive Behandlung (PAT) das Überleben und die funktionelle Prognose nach fokaler zerebraler Ischämie bessern kann. Sofort nach experimentellem Schlaganfall oder mit 12 Stunden Latenz gaben wir alle 2 Stunden das Fluorchinolon Moxifloxacin über 12 Stunden. Wir konnten zeigen, dass sich so Infektionen nach experimentellem Schlaganfall verhindern lassen und die Sterblichkeit geringer ist. Die PAT besserte auch das neurologische Defizit und reduzierte das Schlaganfallvolumen.

Braun JS*, **Prass K***, Dirnagl U, Meisel A, Meisel C. Protection from brain damage and bacterial infection in murine stroke by the novel caspase-inhibitor Q-VD-OPH. *Exp Neurol.* 2007 Aug;206(2):183-91.

(* äquivalenter Beitrag der Autoren)

Zusammenfassung

Die Inhibition der Apoptose nach einem Schlaganfall kann ein interessantes Therapieziel sein. Neben der Reduktion des neuronalen Zelltodes könnte sich so auch das Schlaganfall – induzierte Immundepressionssyndrom günstig beeinflussen lassen. Die meisten bisher im experimentellen Schlaganfallmodell untersuchten Inhibitoren der Apoptose sind toxisch. Wir untersuchten deshalb den Caspaseinhibitor N-(2Quinoly)valyl-aspartyl 2,6-difluorphenoxymethylketon, der als nicht toxisch gilt. Die Gabe dieses Caspaseinhibitors führte zur Reduktion des Schlaganfallvolumens, einer geringeren Sterblichkeit und zur Abnahme der Apoptoserate in lymphatischen Organen.

Eidesstattliche Versicherung

Gemäß der Habilitationsordnung der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Hiermit erkläre ich, an Eides statt, dass:

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

Berlin, den 22.2.2008