

Zytokinexpression in der ischämischen Penumbra nach transientem Verschuß der A. cerebri media in der Ratte

Von der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen
Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen
Grades eines Doktors der Medizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Manuela Peters

aus

Erkelenz

Berichter: Herr Privatdozent
Dr. med. Frank Block
Herr Universitätsprofessor
Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Hubert Korr

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 2002

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

gewidmet
meinen Eltern,
meinem Bruder Marcus
und meinem Mann Oliver

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Klinischer Hintergrund des Schlaganfalls	3
2.2	Pathophysiologische Mechanismen bei der zerebralen Ischämie	5
2.2.1	Die exzitotoxische Phase	6
2.2.2	Die Phase der Periinfarktdepolarisationen	7
2.2.3	Die inflammatorische Phase	8
2.2.3.1	Expression von Zytokinen	9
2.2.3.2	Aktivierung von Entzündungszellen des Blutes	10
2.2.3.3	Die Mikroglia	11
2.2.3.4	Die Astrozyten	12
2.2.3.5	Stickstoffmonoxidsynthetasen (NOS)	13
2.2.4	Die apoptotische Phase	14
2.3	Das Konzept der Penumbra in tierexperimentellen Studien	15
2.4	Fokale Ischämie - Die MCAO als Läsionsmodell	19
2.5	Fragestellung	20
2.5.1	Wie ist die Dynamik der Zytokinexpression in der Penumbra?	20
2.5.2	Gibt es einen zeitlichen Zusammenhang zwischen Zytokinexpression und neuronalem Zelltod in der Penumbra?	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Versuchstiere	21
3.2	Operation und Perfusion	21
3.3	Weiterverarbeitung und Färbemethoden	23

3.3.1	Färbemethoden zur immunhistochemischen Darstellung von IL-1 β , IL-6, TNF- α , i-NOS, n-NOS, GFAP und OX 42	23
3.3.1.1	Avidin-Biotin-Methode	23
3.3.1.2	Durchführung der immunhistochemischen Färbung	24
3.3.2	Färbemethode zur Darstellung von TUNEL	26
3.3.2.1	TUNEL-Methode	26
3.3.2.2	Durchführung der TUNEL-Färbung	26
3.3.3	Färbemethode zur Darstellung von NISSL	27
3.3.3.1	NISSL-Methode	27
3.3.3.2	Durchführung der NISSL-Färbung	27
3.4	Auswertung	28
3.4.1	Läsionsidentifikation im ischämischen Kortex anhand der NISSL- Färbung	29
3.4.2	Ausmessung der Penumbra im ischämischen Kortex	30
3.4.3	Semiquantitative Auswertung der Anzahl von IL-1 β , IL-6, TNF- α , i-NOS, n-NOS, TUNEL und NISSL positiven Zellen im ischämischen Kortex und der NISSL positiven Zellen in der „Spiegelbildpenumbra“	30
3.4.4	Dichtemessungen	31
3.4.4.1	Auszählung der positiven Zellen im Infarktareal des ischämischen Kortex	31
3.4.4.2	Auszählung der positiven Zellen in der Penumbra des ischämischen Kortex	31
3.4.4.3	Auszählung der positiven Zellen im gesunden Gewebe des ischämischen Kortex	31
3.4.4.4	Auszählung der „Spiegelbildpenumbra“ im kontralateralen gesunden Kortex	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Infarktmuster im zeitlichen Verlauf anhand der NISSL-Färbung	33
4.2	GFAP-Immunhistochemie	35
4.3	OX 42-Immunhistochemie	37
4.4	IL-1 β -Immunhistochemie	39
4.5	IL-6-Immunhistochemie	42

4.6	TNF- α -Immunhistochemie	45
4.7	i-NOS-Immunhistochemie	48
4.8	n-NOS-Immunhistochemie	51
4.9	TUNEL-Färbungen	54
4.10	NISSL-Färbungen	57
4.10.1	NISSL-Färbung im ischämischen Kortex	57
4.10.2	NISSL-Färbung in der „Spiegelbildpenumbra“	57
5	Diskussion	59
5.1	Bestätigung des „Fadenmodells“ der MCAO als Läsionsmodell	59
5.2	Dynamische Veränderungen in der ischämischen Penumbra	62
5.2.1	Die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α	62
5.2.1.1	Expression von IL-1 β	62
5.2.1.2	Expression von TNF- α	64
5.2.1.3	Expression von IL-6	65
5.2.2	Die Stickstoffmonoxidsynthetasen i-NOS und n-NOS	67
5.2.2.1	Expression von i-NOS	67
5.2.2.2	Expression von n-NOS	69
5.2.3	Zellschaden	70
5.3	Wertung	71
5.4	Mögliche klinische Relevanz	73
5.5	Ausblick	75
A	Danksagung	91
B	Lebenslauf	93

Kapitel 1

Zusammenfassung

Der Schlaganfall steht an dritter Stelle der Todesursachenstatistik. Dennoch existieren zur Zeit kaum befriedigende Behandlungskonzepte für den ischämischen Insult. Zweidrittel aller Hirninfarkte betreffen das Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media. Vor diesem Hintergrund ist die Okklusion der A. cerebri media mit Hilfe eines intraluminal vorgeschobenen Fadens in der Ratte ein relevantes Modell in der tierexperimentellen Ischämieforschung.

Pathophysiologische und zelluläre Mechanismen in der ischämischen Penumbra, d.h. in der den Infarktkern umgebenden Gewebezone, haben in der letzten Zeit steigendes Interesse geweckt. Bei der Penumbra handelt es sich um minderperfundiertes Gewebe mit erloschenem Funktionsstoffwechsel bei erhaltener morphologischer Struktur der Zellen.

Die vorliegende Studie untersuchte dynamische Prozesse in der Penumbra über den relativ langen Zeitraum vom 1., 3., 7. bis hin zum 14. postischämischen Tag nach einem Medianinsult anhand immunhistochemischer Färbungen.

Das Tiermodell der MCAO (Okklusion der A. cerebri media) führte zu einem reproduzierbaren Zellschaden im lateralen und medialen Striatum und im angrenzenden Kortex. Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbungen konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß sich in der Penumbra bis zum 14. Tag nach der fokalen zerebralen Ischämie Entzündungsvorgänge abspielen, die u.a. auch mit neuronalem Zellschaden in Zusammenhang stehen könnten.

Bis zum 14. postischämischen Tag färbten sich IL-1 β -, IL-6- und TNF- α -positive Zellen in der ischämischen Penumbra an, deren Zellmorphologie an Gliazellen oder an Neurone erinnerte. Zeitgleich fand eine Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase

(i-NOS) statt, in deren Gefolge das Gas Stickstoffmonoxid (NO) und schließlich das stark zytotoxische Peroxinitrit produziert wird. Die Expression der i-NOS hielt ebenfalls bis zum 14. postischämischen Tag an. Anhand von TUNEL-Färbungen („TdT-mediated dUTP nick end labeling“), die Apoptose bzw. Nekrose aufdecken, ließ sich in dieser Studie auch ein Zelltod nachweisen. Ein Rückgang an intakten Neuronen konnte durch den immunhistochemischen Marker für die neuronale NOS (n-NOS), der eine Subpopulation der Neurone anfärbt, aufgezeigt werden. Möglicherweise gehen also selbst zwei Wochen nach dem ischämischen Insult noch Neurone in der Zone der Penumbra zugrunde.

Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, daß die Dynamik in der Penumbra noch bis zum 14. Tag nach der Ischämie anhält. Diese Erkenntnis ist in Betracht zu ziehen, wenn in sich anschließenden Schritten Versuche der Neuroprotektion durch geeignete Pharmaka unternommen werden, um einem Verlust der potentiell rettbaren Gewebezone um den nekrotischen Infarktkern entgegenzuwirken.

Kapitel 2

Einleitung

2.1 Klinischer Hintergrund des Schlaganfalls

Der Schlaganfall steht nach dem Herzinfarkt und den malignen Tumoren in den USA, in Großbritannien und auch in der Bundesrepublik Deutschland an dritter Stelle der Todesursachenstatistik [46, 117]. In Deutschland kann man von ca. 200.000 ischämischen Insulten pro Jahr ausgehen [16]. Nach dem Schlaganfallereignis sterben ca. 15-30 % der Patienten innerhalb der ersten 30 Tage. Von den Patienten, die den Schlaganfall überleben, ist für nur etwa ein Drittel ein Leben ohne Einschränkungen wie vor dem Schlaganfall möglich. Ein Drittel ist durch die Folgen des Schlaganfalls, wie z.B. durch Lähmungen, auf eine Weise beeinträchtigt, daß einfache alltägliche Aufgaben von den Patienten zwar erfüllt werden können, die Patienten aber nicht mehr berufsfähig sind. Das letzte Drittel der Betroffenen bleibt invalidisiert [97]. Somit kann dem Schlaganfall eine ganz erhebliche sozioökonomische Bedeutung zugeschrieben werden, da er für den Patienten sozialer Kompetenzverlust, Abhängigkeit und schwere Behinderungen bedeuten kann.

Arterielle Gefäßverschlüsse und arterielle Blutungen zählen zu den zwei wichtigsten Ursachen von Schlaganfällen [102]. Arterielle Gefäßverschlüsse können auf dem Boden von Embolien oder lokalen Thrombosen entstehen [97]. Bei über 80 % der Schlaganfälle handelt es sich um ischämische Infarkte. Ungefähr 10 % sind auf hämorrhagische Infarkte und etwa 5 % sind auf Subarachnoidalblutungen zurückzuführen. Weitere 5 % lassen sich nicht zuordnen, insbesondere dann, wenn ältere Menschen betroffen sind, die direkt am Schlaganfallereignis versterben [53].

Zwei Drittel aller Hirninfarkte betreffen das Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media

(MCA) [53]. Das wichtigste Symptom eines Mediainfarkts bei Läsionen des Kortex oder der inneren Kapsel ist die kontralaterale Hemiparese. Klassischerweise bildet sich eine brachiofazial betonte Halbseitenlähmung vom Typ Wernicke-Mann aus, bei der Gesicht und Arm stärker betroffen sind als das Bein. Bei Beteiligung der dominanten Hemisphäre ist der Schlaganfall im Medialstromgebiet von neuropsychologischen Symptomen wie z.B. Aphasie oder Apraxie begleitet. Bei Schädigung der nicht dominanten Hemisphäre kommt es zur Halbseitenvernachlässigung (Neglect) [53]. Der Schlaganfall kann zudem zu Anosognosie, Veränderungen der Psyche, des Intellekts, der räumlichen Orientierung und des Gleichgewichtes führen [46].

Dennoch gibt es zur Zeit kaum befriedigende Behandlungskonzepte für den ischämischen Insult. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Arbeit auf der Ebene der Primär- und Sekundärprävention. Die Mortalitätsrate des Schlaganfalls ist in der letzten Hälfte dieses Jahrhunderts gesunken [25, 109]. Dieser Erfolg war insbesondere durch die antihypertensive Therapie als wichtigste primär- und sekundärpräventive Maßnahme möglich, da die Hypertonie als Risikofaktor für einen Schlaganfall an erster Stelle steht [109]. Auch die Gabe von Acetylsalicylsäure und Ticlopidin bei der transitorischen ischämischen Attacke (TIA), beim (prolongierten) reversiblen ischämischen neurologischen Defizit ((P)RIND) und beim manifesten Hirninfarkt, die Antikoagulation bei Vorhofflimmern und die Karotisendarteriektomie bei höhergradigen Stenosen haben in der Sekundärprävention zu einer Risikoreduktion für einen Hirninfarkt beigetragen [109, 117]. Allerdings fehlen Behandlungsstrategien für den akuten Schlaganfall, d.h. die unmittelbare Behandlung der zerebralen Ischämie im Moment oder kurz nach ihrem Auftreten mit dem Ziel, die zelluläre Läsion als Folge der Perfusionsstörung zu mindern oder zu verhindern. Neben basistherapeutischen Maßnahmen wie die Einstellung des Blutdrucks auf grenzwertig hypertone Werte, die Herstellung von Normoglykämie und Normothermie stellt die Thrombolyse mit rt-PA die zur Zeit einzige gesichert wirksame Behandlungsmethode des akuten Hirninfarkts dar. Sie muß innerhalb von 3 Stunden beginnen, nachdem im CT eine Blutung und ein großer früher Infarkt ausgeschlossen worden sind [97].

Diese Ausführungen machen deutlich, daß Handlungsbedarf zur Entwicklung neuer Therapieansätze für den akuten Schlaganfall besteht. Insbesondere die pathophysiologischen und zellulären Mechanismen in der Zone der Penumbra, d.h. in dem den Infarktkern umgebenden Gewebe, haben steigendes Interesse geweckt, da das Konzept der Penumbra (vgl. Kapitel 2.3) zu der Vorstellung führt, daß betroffene Areale noch relativ lange nach

einem ischämischen Ereignis durch geeignete therapeutische Maßnahmen beeinflusst werden können.

2.2 Pathophysiologische Mechanismen bei der zerebralen Ischämie

Das Gehirn mit nur 2 % der Körpermasse benötigt 20 % des Herzzeitvolumens, um seinen verglichen mit anderen Organen außerordentlich hohen Bedarf an Sauerstoff und Glukose zu decken. Deshalb führt eine Mangel durchblutung in sehr kurzer Zeit zu reversiblen, funktionellen und irreversiblen, strukturellen Ausfällen.

Die Schädigungskaskade nach einer zerebralen Ischämie ist ein komplexes Geschehen. Durch den Substratmangel wird eine Schädigungskaskade in Gang gesetzt, die sich über Stunden, Tage bis Wochen erstreckt und über verschiedene Phasen abläuft, die sich zeitlich zum Teil überlappen (Abb. 2.1). Zu den Elementen dieser Kaskade zählen [53]:

- die exzitotoxische Phase
- die Phase der Periinfarktdepolarisationen
- die inflammatorische Phase
- die apoptotische Phase

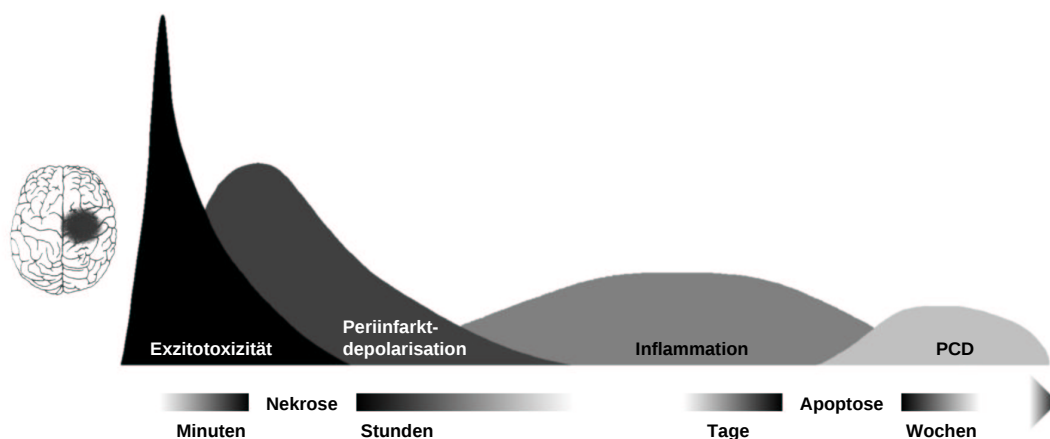


Abbildung 2.1: Zeitlicher Ablauf der Schädigungskaskade bei zerebraler Ischämie (PCD-programmierter Zelltod) (aus [53])

2.2.1 Die exzitotoxische Phase

Die Schädigungskaskade beginnt mit der Phase der Exzitotoxizität, die Minuten bis Stunden nach Beginn der Ischämie anhält.

Die Unterbrechung einer adäquaten Glukose- und Sauerstoffzufuhr durch die Mangeldurchblutung des Gehirns führt zur Abnahme bzw. Verarmung an energiereichen Phosphaten wie ATP, CTP, UTP und GTP [106]. Daraufhin stellt der Glukosemetabolismus auf anaerobe Glykolyse um, und es kommt zur Akkumulation von Laktat und somit zur Azidose [62]. Die Azidose schränkt zum einen die intrazelluläre Resynthese von Polysacchariden, Phospholipiden, Proteinen und Nukleinsäuren ein und begünstigt zum anderen die Entstehung toxischer Radikale [106].

Durch den Ausfall der Synthese von ATP und den anderen Triphosphaten sind die energieabhängigen Ionenpumpen, insbesondere die Natrium-Kalium-Pumpen, in ihrer Funktion gestört. Die Ionenhomöostase gerät aus dem Gleichgewicht. Der aktive Ionentransport, durch den Natrium in den Extrazellulärraum und Kalium in den Intrazellulärraum geschafft wird, kann den passiven Ionenfluß aufgrund des Energiemangels in den Zellen nicht mehr ausgleichen. So strömen Natrium und Kalzium passiv in das Zellinnere und depolarisieren auf diese Weise die Zellmembranen [105]. Die Depolarisation der Zellen wiederum führt zu einem weiteren Einstromen von Kalzium über sog. spannungsabhängige Kalziumkanäle [107].

Diese Vorgänge triggern die Ausschüttung einer Reihe von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Es werden exzitatorische Aminosäuren (EAA), vor allem Glutamat, in den Extrazellulärraum freigesetzt. Sowohl tierexperimentelle [15] als auch klinische Studien [26] mittels Mikrodialyse deuten darauf hin, daß es sich bei Glutamat um den dominanten Neurotransmitter für die Phase der Exitotoxizität handelt. Durch kalzium-induzierte Stimulation der präsynaptischen Endigungen und durch Störung der Wiederaufnahme und Inaktivierung von Glutamat aufgrund des Energiemangels in Astrozyten und postsynaptischen Neuronen kommt es zur exzessiven Erhöhung der extrazellulären Konzentration von Glutamat [88]. Glutamat aktiviert zwei Arten von Rezeptoren: die metabotropen Glutamat-Rezeptoren, die über G-Proteine und Second-Messenger intrazelluläre Prozesse in Gang setzen, und die ionotropen Glutamat-Rezeptoren, die durch Liganden aktiviert werden [107]. Bindet Glutamat an die metabotropen Rezeptoren, so entsteht durch die Aktivierung der Phospholipase C 1,2-Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3). IP3

bindet an seinen Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum und stimuliert die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern [62]. Bei den ionotropen Rezeptoren unterscheidet man wiederum drei verschiedene Untergruppen: den N-methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptor, den α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionat-(AMPA)-Rezeptor und den Kainat-Rezeptor [107]. Die hohe extrazelluläre Glutamatkonzentration führt zum vermehrten Kalziumeinstrom in die Zelle über die o.g. Rezeptoren und über die Aktivierung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle. Die ansteigende intrazelluläre Konzentration von zytosolischem Kalzium aufgrund der glutaminergen Aktivierung und der Ionenpumpenstörung führt zur Aktivierung einer Vielzahl von kalzium-stimulierten Enzymen wie Proteasen, Lipasen, Nukleasen, Proteinkinasen und Nitritoxidsynthetasen [62]. Dies hat einen Abbau von Proteinen und Lipiden der Zellmembranen und eine DNA-Schädigung zur Folge.

Darüber hinaus entstehen durch die Aktivierung kalziumabhängiger Enzymsysteme auf der einen und durch die sich anschließende Reperfusion auf der anderen Seite freie hochreaktive Radikalspezies [95]. Sauerstoffradikale sind wahrscheinlich insbesondere dann wichtige Mediatoren bei Zellschädigungen, wenn Sauerstoff durch die sich der Ischämie anschließende Reperfusion als Substrat wieder verfügbar wird [53]. Durch die Reaktion der freien Radikale mit den Fetten der Zellmembranen kommt es zur Lipidperoxidation, durch welche weitere Radikale gebildet werden. Auch alle anderen Zellbestandteile können durch die Radikale angegriffen werden wie z.B. Kohlenhydrate, Proteine und DNA [106], so daß eine Schädigung der Zellmembranen, des Zytosols mit seinen Zellorganellen und des Zellkerns resultiert.

2.2.2 Die Phase der Periinfarktdepolarisationen

An die Phase der Exitotoxizität schließt sich die Phase der Periinfarktdepolarisationen an. Durch die anoxische bzw. exzitotoxische Depolarisation der Zellen steigen die extrazellulären Konzentrationen von Glutamat und Kalium im Infarktkern an. Glutamat und Kalium diffundieren daraufhin in die Penumbrazone. Dort werden weitere Neurone und Gliazellen exzitatorisch bzw. elektrochemisch depolarisiert. Diese Neurone und Gliazellen reagieren mit einer weiteren Ausschüttung von Kalium und Glutamat [53]. Auf diese Weise entsteht eine Depolarisationswelle (Periinfarktdepolarisation), die sich mit einer Geschwindigkeit von annähernd 3 mm/min vom ischämischen Herd wegbewegt und sich über den gesamten Kortex ausbreitet [55].

In dem gesunden, normal perfundierten Gewebe in der Peripherie der Hemisphäre, die vom Infarkt betroffenen ist, sind die sog. „repetitive spreading depression (SD)-like depolarizations“ mit einem parallelen Anstieg des Blutflusses gekoppelt [55]. So ist eine ungestörte Versorgung mit Sauerstoff in der Peripherie sichergestellt, und das intakte Hirngewebe wird nicht geschädigt. Im Gegensatz dazu verhindert eine reduzierte hämodynamische Kapazität des Kollateralensystems in der Penumbra während jeder Depolarisationswelle eine adäquate Oxygenation. Es resultieren Episoden von Gewebshypoxie [55]. Außerdem sind Periinfarktdepolarisationen mit einem erhöhten Glukosemetabolismus trotz des ohnehin schon reduzierten Substratangebotes verbunden [8].

Periinfarktdepolarisationen sind folglich ein zusätzlicher Stressor für die Penumbra. Dies spiegelt sich auch in genetischen Auffälligkeiten wie der Aktivierung der „immediate early genes“ (IEG, Gene der frühen Phase), die für Transkriptionsfaktoren kodieren, der Expression von Streßproteinen wie dem Hitzeschockprotein HSP-70 und einer Proteinsynthesereduktion, die als Ausdruck eines Schutzmechanismus der Zelle vor Genomveränderungen oder Zelltod angesehen werden kann, wider [55].

Untersuchungen zeigen, daß das Volumen des Infarktes mit der Anzahl der Periinfarktdepolarisationen korreliert [7]. Somit können Periinfarktdepolarisationen zur schrittweisen Vergrößerung des eigentlichen Infarktkerns in die Penumbrazone beitragen [55].

2.2.3 Die inflammatorische Phase

Bis vor einigen Jahren wurde das Gehirn als eine Art „immune privileged site“ betrachtet größtenteils durch die Bluthirnschranke vom peripheren Immunsystem abgeschirmt. Es zeigte sich jedoch, daß enge Parallelen zwischen den Prozessen und Molekülen im peripheren Immunsystem und im Gehirn bestehen, in dem antigenpräsentierende, antikörperproduzierende und phagozytoseaktive Zellen, Komplementfaktoren und Zytokinsynthese ausgemacht werden konnten [100]. Heute geht man davon aus, daß das Immunsystem und das zentrale Nervensystem nicht getrennt voneinander funktionieren, sondern daß es viele Überschneidungen gibt und daß sie sich gegenseitig in ihrer Arbeit beeinflussen.

So folgt der Phase der Periinfarktdepolarisationen innerhalb von Stunden die inflammatorische Phase, eine Entzündungsreaktion des von der Ischämie betroffenen Gehirns, und hält über Tage bis Wochen an. Sie wird bestimmt durch die Expression proinflammatorischer Mediatoren wie die der Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), durch die Expression von Stickstoffmonoxidsynthetasen,

durch eine ausgeprägte Leukozyten-Endothel-Interaktion, durch die Transmigration von Leukozyten und Blutmakrophagen ins Hirnparenchym sowie durch die Aktivierung von immunkompetenten Zellen des ZNS, der Mikroglia und der Astrozyten [53].

Inwieweit diese postischämischen intrazerebralen Entzündungsprozesse schädigend auf das Hirngewebe einwirken bzw. inwieweit sie auch mit Reperaturprozessen assoziiert sind, ist z.Z. Gegenstand intensiver Forschung.

2.2.3.1 Expression von Zytokinen

Zu den intra- oder postischämischen Prozessen gehört die Ausschüttung von Zytokinen, die als Botenstoffe agieren. Es handelt sich dabei um eine große Gruppe von Polypeptiden, zu der Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, zellenstimulierende Faktoren und Tumornekrosefaktoren zählen. Ihre konstitutive Expression ist gewöhnlich niedrig [100], sie kann aber in der Situation einer zerebralen Ischämie hochreguliert sein [52].

Die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α werden im ZNS von Mikrogliazellen, Astrozyten, Neuronen und Endothelzellen produziert [2].

Verschiedene Studien haben gezeigt, daß IL-1 β -mRNA und IL-1 β -Protein schon in der frühen Phase der Ischämie synthetisiert werden [17]. Die exogene Injektion von IL-1 β in das ischämische Gehirn führt zu einer Vergrößerung des sich nach der Ischämie entwickelnden Ödems und des Infarktes [17]. Wird IL-1 β in die zerebralen Ventrikel oder in spezifische Hirnregionen von Versuchstieren injiziert, so verursacht es Fieber, Hypophagie, Hyperinsulinämie, Gliaproliferation, Neovaskularisation und Veränderungen im Verhalten der Tiere [17]. Das Freisetzen von Eicosanoiden und von anderen Zytokinen wie IL-2, IL-6, IL-8 durch IL-1 β können indirekt zu einer Vergrößerung des Zellschadens beitragen [17]. Eine Stimulation der Endothelzellen durch IL-1 β führt zur Produktion eines Faktors, der neutrophile Zellen aus dem Blut anlockt. Diese können dann über Leukozytenadhäsionsmoleküle in das Hirnparenchym eindringen [17] und auf diese Weise die zerebrale Entzündungsreaktion aufrechterhalten. Im Gegensatz dazu führen die Induktion von „nerve growth factor“, die Blockade von Kalziumkanälen und die Verstärkung von GABA-Neurotransmission durch IL-1 β zu einer Begrenzung des ischämischen Zellschadens [17].

Nach einer zerebralen Ischämie sind erhöhte TNF- α -Spiegel im Hirngewebe, im Liquor und im Plasma von Versuchstieren aufgedeckt worden [45]. Die intrazerebrale Injektion von TNF- α in Versuchstiere führt im Vergleich zu IL-1 β zu identischen proinflammatorischen Effekten. So tragen die Aktivierung von Mikroglia, Astrozyten und Neutrophilen,

die Induktion von zellulären Adhäsionsmolekülen und Veränderungen an der Durchlässigkeit der Bluthirnschranke zum ischämischen Zellschaden bei [100].

Dem Zytokin IL-6 werden neben proinflammatorischen auch antiinflammatorische Effekte zugeschrieben. IL-6 antagonisiert die Effekte von IL-1 β und TNF- α , indem es die Produktion dieser beiden Zytokine hemmt und indem es die Produktion der korrespondierenden zirkulierenden IL-1-Rezeptor(IL-1RA)- und TNF- α -Rezeptor-Antagonisten stimuliert. Da IL-1RA um denselben Rezeptor konkurriert, ist es in der Lage, die Aktivität von IL-1 zu blockieren [13].

2.2.3.2 Aktivierung von Entzündungszellen des Blutes

Die Aktivierung der Entzündungszellen, die aus dem Blut stammen, ist ein früher und wesentlicher Schritt in der akuten Phase der Ischämie. Sie ist durch die Invasion von Leukozyten gekennzeichnet.

Nach der durch die Ischämie bedingten Störung der Bluthirnschranke können periphere, immunreaktive Zellen in das Hirnparenchym einwandern und die Produktion von Zytokinen verstärken. Blutmakrophagen bewegen sich durch Chemotaxis direkt zum geschädigten Hirnparenchym, erkennen die Zelltrümmer, beginnen mit der Phagozytose und damit mit dem Abräumen der Zelltrümmermassen [122]. Sog. „polymorphonuclear leukocytes“, polymorphkernige Leukozyten (PMN, Neutrophile), infiltrieren den Ischämiekern 12 bis 24 Stunden nach der Ischämie. Blutmakrophagen wandern massiv nach 2-3 Tagen in die Ischämiezone ein [67].

Hoch spezifische Rezeptor-Ligand-Interaktionen ermöglichen den Leukozyten die Adhäsion an Endothelzellen und die Migration von Neutrophilen und Makrophagen. Die Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen wird reguliert durch die Interaktion zwischen interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) auf den Endothelzellen und einer Gruppe von Glykoproteinen (CD11b/CD18, MAC-1) auf den Leukozyten. Die Expression von ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 und einer Reihe anderer Adhäsionsmoleküle wie P-Selectin und E-Selectin wird durch die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α gesteigert [62, 39]. Es konnte gezeigt werden, daß die Gabe von Antikörpern gegen das Adhäsionsmolekül ICAM-1 oder gegen die Glykoproteine CD11b/CD18 zu einer Reduktion des postischämischen Ödems, der Infarktausbreitung und der Infiltration der Neutrophilen in das Infarktgebiet führt [83].

Die Einwanderung und die Akkumulation von Neutrophilen und Makrophagen kann zwar

mit Reparaturprozessen am ischämischen Gewebe verbunden sein, steht aber auch in Verdacht potentiell lebensfähigem, funktionstüchtigem Gewebe zu schaden. Man nimmt an, daß ein sekundärer Schaden zum einen dadurch bedingt ist, daß ein frühes Verstopfen der Kapillaren mit den aktivierten Entzündungszellen zum sog. „no-reflow“-Phänomen und damit zu einer lokalen Reduktion des Blutflusses führt [40]. Zum anderen wird die Freigabe von Proteasen und freien Sauerstoffradikalen durch die Aktivierung der Entzündungszellen als mögliche Ursache für den weiteren Zellschaden angesehen [62].

2.2.3.3 Die Mikroglia

Die Mikrogliazellen werden neben den Astrozyten als die Immunzellen des ZNS angesehen. Sie leiten sich vom Monozyten-Makrophagen-System ab. Mikrogliazellen wandern über Gefäße, über die Meningen und über subependymales Gewebe während der Embryogenese und der frühen postnatalen Periode in das sich entwickelnde Gehirn ein [12]. Sie phagozytieren Zelltrümmer und resorbieren und modellieren Nervenfasern. Wenn diese Umwandlungsprozesse abgeschlossen sind, wandeln sie sich von der kugeligen, amöboiden, phagozytoseaktiven Form in die ramifizierte, residente Mikroglia des gesunden, reifen ZNS um. Die Mikrogliazellen werden auf diese Weise zu ortsständigen Gewebsmakrophagen des Gehirns [12].

Die residente Mikroglia kann erneut aktiviert werden. Bei ihrer Aktivierung verändert sie ihre Morphologie wieder von der ramifizierten zu der amöboiden Form, beginnt zu proliferieren und wandelt sich schließlich in Makrophagen um [12]. Im aktivierten Zustand sind Mikrogliazellen von den eingewanderten, phagozytierenden Blutmakrophagen nicht mehr zu unterscheiden [53].

Im reifen Gehirn macht die residente, ramifizierte Mikroglia 5-20 % der Neuroglia aus [12]. Sie siedelt sich um die Gefäße und in der Nähe von Neuronen an und teilt sich viele Antigenmarker mit den zirkulierenden Monozyten, die allerdings bei Mikrogliazellen im Ruhezustand herunterreguliert sind. Im aktivierten Zustand können Mikrogliazellen Klasse I- und II-MHC-(major histocompatibility complex)-Rezeptorproteine, Komplementrezeptoren wie den Komplementrezeptor CR3, der immunhistochemisch durch einen monoklonalen Antikörper gegen OX 42 in der Ratte darstellbar ist [110], und die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α als Ausdruck ihrer Immunkompetenz exprimieren [12].

Mikrogliazellen spielen eine paradoxe Rolle in der zerebralen Ischämie. Auf der einen Seite antworten die aktivierten Mikrogliazellen auf die Ischämie mit der Phagozytose der

Zelltrümmer und setzen Wachstumsfaktoren zur Förderung der „Wundheilung“ frei. Sie sezernieren eine Reihe von neurotrophen Peptiden oder Zytokinen wie Interleukin IL-6, Plasminogen und „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) [114]. Auf der anderen Seite sezernieren die Mikrogliazellen aber auch zytotoxische Stoffe wie reaktive Sauerstoffradikale, Proteasen, Glutamat [62] und Nitritoxide [69], die zum Untergang der Nervenzellen beitragen können.

2.2.3.4 Die Astrozyten

Die Astrozyten zählen neben den Mikrogliazellen zu den Immunzellen des ZNS. Sie sorgen im Gehirn dafür, daß die empfindlichen Gleichgewichte aufrecht erhalten werden. Sie sind an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt und erhalten die Wasser- und Ionenhomöostase [62]. In der Phase der Embryonalentwicklung stellen die Astrozyten ein „Baugerüst“ zur Verfügung, mit dessen Hilfe Neurone einwandern und ihren Platz im Hirngewebe finden können. Es ist möglich, daß die Astrozyten im Rahmen einer zerebralen Ischämie diese Aufgabe wiederholen [72].

Eine zerebrale Ischämie induziert sowohl morphologische als auch biochemische Veränderungen in den Astrozyten. Sie antworten mit Hypertrophie und Hyperplasie auf die Ischämie [31]. Astrozyten können immunhistochemisch durch die GFAP (glial fibrillary acidic protein)-Färbung gegen ein Intermediärfilament des Zytoskeletts identifiziert werden [110]. Da sich in der den Infarktbereich umgebenden Penumbra eine besondere Proliferation und Hypertrophie an GFAP-positiven Astrozyten zeigt [35], konnte man sich diesen Umstand in der vorliegenden Arbeit zu Nutze machen, um die Breite der Penumbrazone im Kortex zu definieren und auszumessen.

Astrozyten sind in der Lage, in die Synapsen freigesetzte Neurotransmitter wie die exzitatorische Aminosäure (EAA) Glutamat wiederaufzunehmen und zu inaktivieren. Die Glutaminsynthetase, die nur in Astrozyten vorkommt und die Glutamat inaktiviert, steigt früh nach einer zerebralen Ischämie an. Auf diese Weise kann der extrazelluläre Anstieg von Glutamat kompensiert und das Hirn vor den neurotoxischen Effekten dieser EAA teilweise geschützt werden [96]. Obwohl aktivierte Astrozyten Wachstumsfaktoren freisetzen, die axonales Wachstum stimulieren, konnte auch gezeigt werden, daß ihre Akkumulation axonales Wiederaussprossen unterdrücken kann [2]. Zudem zeigen die Astrozyten auf die Exposition mit Zytokinen in vitro eine Transskription von Stickstoffmonoxid-Synthasen, die zur Produktion des zytotoxischen Gases NO führen [93].

2.2.3.5 Stickstoffmonoxidsynthetasen (NOS)

Das Gas Stickstoffmonoxid (NO) ist an den unterschiedlichsten Vorgängen wie Plättchenaggregation und -adhäsion, Vasodilatation, Neurotransmission, Zytostase und Zytotoxizität beteiligt [37]. Es wird durch Stickstoffmonoxid-Synthetasen (NOS) gebildet, die die Umwandlung von L-Arginin zu NO und L-Zitrullin in Anwesenheit von Sauerstoff und NADPH katalysieren [101].

Man unterscheidet drei Isoformen der NOS: die neuronale NOS (n-NOS), die induzierbare NOS (i-NOS) und die endotheliale NOS (e-NOS).

Die n-NOS wird von einer kleinen Neuronenpopulation im ZNS kalziumabhängig konstitutiv exprimiert. Sie spielt eine Rolle in der frühen Phase eines ischämischen Zellschadens. Schon innerhalb der ersten 10 Minuten erfolgt eine Hochregulation der n-NOS-Aktivität bzw. des n-NOS-Proteins in der ischämischen Läsion, um nach 3 Stunden das Maximum zu erreichen [101]. Im Gegensatz dazu tritt die i-NOS erst zu einem späteren Zeitpunkt in Erscheinung. 12 Stunden nach einer Ischämie kann ein Anstieg der i-NOS-Aktivität im Infarktareal nachgewiesen werden, nach 48 Stunden hat sie das Maximum erreicht, um nach 7 Tagen wieder auf normale Werte abzusinken [59]. Die i-NOS ist induzierbar. Sie wird im gesunden Gewebe nicht angetroffen und erst unter pathologischen Bedingungen kalziumunabhängig in Makrophagen, Mikrogliazellen, Neuronen, Astrozyten und in Endothelzellen synthetisiert [101]. Die e-NOS ist in den zerebralen Endothelzellen lokalisiert. Sie schützt das Hirngewebe durch die Produktion von NO, das vasorelaxierend wirkt und den regionalen Blutfluß aufrecht erhält [101].

Liegt NO in gasförmiger Form vor, so ist es in der Lage, durch Zellmembranen zu diffundieren [80]. Liegt NO in Radikalform vor, so kann es durch die Reaktion mit einem Superoxid zur Bildung des stark zytotoxischen Peroxinitrits führen [37] oder direkt als freies Radikal Proteine, DNA oder Membranlipide schädigen [37].

Ein weiterer Hinweis für den zellschädigenden Charakter der NOS konnte anhand von Untersuchungen an sog. „Knockout-Mäusen“ erbracht werden. „NOS-Knockout-Mäusen“ fehlt im Gegensatz zu den Wildtypmäusen das Gen zur Expression der jeweiligen NOS. Nach einer fokalen Ischämie zeigten sich kleinere Infarkte und weniger motorische Defizite bei i-NOS- [58] bzw. eine Reduktion des Infarktvolumens und des Hirnödems bei n-NOS-„Knockout-Mäusen“ [48] als bei den Wildtypmäusen.

2.2.4 Die apoptotische Phase

Tage bis Wochen nach der Ischämie kommt es zum programmierten Zelltod (Apoptose). Apoptose ist ein besonderer Typ von Zelltod, der in der Embryogenese, aber auch in gesundem, adultem und in pathologisch verändertem Gewebe in Erscheinung tritt [73]. Apoptose als Konzept für den sog. „delayed neuronal death“, also für den verzögerten Zelltod, ist ein sehr aktuelles und vielfach verfolgtes Konzept der neuronalen Schädigung nach der Initialphase der Ischämie.

Die Apoptose unterscheidet sich von der Nekrose durch ihre Morphologie [64]. Im Gegensatz zu nekrotischen Zellen zeigen apoptotische Zellen eine Chromatinverdichtung an der Kernmembran, eine Zellschrumpfung, bei der die Zellorganellen erhalten bleiben, eine Absonderung der apoptotischen Zellen von den umliegenden Zellen und eine Formierung des Kerns und des Zytoplasmas zu membrangebundenen Fragmenten, die als „apoptotic bodies“ bezeichnet werden. Nekrotische Zellen zeichnen sich dagegen durch eine frühe Zellschwellung, durch die Dilatation der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums und letzten Endes durch die Ruptur der Kern-, Organell- und Plasmazellmembranen aus [64].

Apoptose wird durch ein inneres, genetisch gesteuertes Selbstzerstörungsprogramm der Zelle möglich [103]. Es sind sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Gene bekannt. Das am meisten untersuchte Gen ist das antiapoptotisch wirkende bcl-2-Gen. Bcl-2 bzw. sein Genprodukt scheint antioxidativ zu wirken, indem es zu einer Reduktion freier Sauerstoffradikale führt [56]. Zudem ist es an der Erhaltung des mitochondrialen Membranpotentials beteiligt, dessen Zusammenbruch unweigerlich zum Zelltod führt, da eine Schädigung der Mitochondrien u.a. die Atmungskette und den Kalziumhaushalt der Zelle beeinträchtigt und deshalb als Schlüsselereignis für die Apoptose angesehen wird [56].

Ein wichtiges Zeichen für Apoptose ist die DNA-Fragmentation. Die Aktivierung einer Endonuklease führt zur Spaltung der DNA und zur Entstehung einer Vielzahl von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 180 bis 200 Basenpaaren [74]. Es hat sich gezeigt, daß sich die Zellen, die eine Fragmentation der DNA aufweisen, primär in den Grenzzonen des Infarktes befinden [73], wohingegen Nekrose im Ischämiekern anzusiedeln ist [44].

Apoptose könnte in der Ausweitung des Infarktes nach MCAO in die Penumbra eine Rolle spielen, da die Neurone in der Penumbra ischämisch weniger schwer betroffen sind als im Ischämiekern, so daß sie eher durch Apoptose als durch Nekrose zugrunde gehen.

2.3 Das Konzept der Penumbra in tierexperimentellen Studien

Bei der fokalen zerebralen Ischämie ist durch den Verschluß eines großen intrazerebralen Gefäßes nur ein bestimmtes Hirnareal von der Mangeldurchblutung betroffen. Es entwickelt sich akut ein Ischämiekern im zugehörigen Gefäßterritorium. Der Ischämiekern zeigt eine schwere Pannekrose, von der alle Zelltypen (Neurone, Glia, Endothelzellen) betroffen sind, und ist von einer ischämischen Randzone umgeben. Dieses minderperfundierte Gewebe, das das nekrotische Kerngebiet umgibt, mit erloschenem Funktionsstoffwechsel und erhaltener morphologischer Struktur der Zellen wird als „ischämischer Halbschatten“, als Penumbra, bezeichnet [4]. Die Penumbra wird nicht als eine statische, sondern als eine dynamische Region angesehen, die im ungünstigen Fall in einen Infarkt umgewandelt werden kann (Abb. 2.2). Im günstigen Fall kann die Penumbra oder wenigstens ein Teil von ihr gerettet werden. Man nimmt an, daß durch geeignete neuroprotektive Pharmaka eine Ausdehnung des Infarktes auf die Penumbra verhindert werden kann, so daß es auf diese Weise zu einer Schadenseingrenzung kommen und eine größere Menge intakten Gewebes erhalten werden könnte.

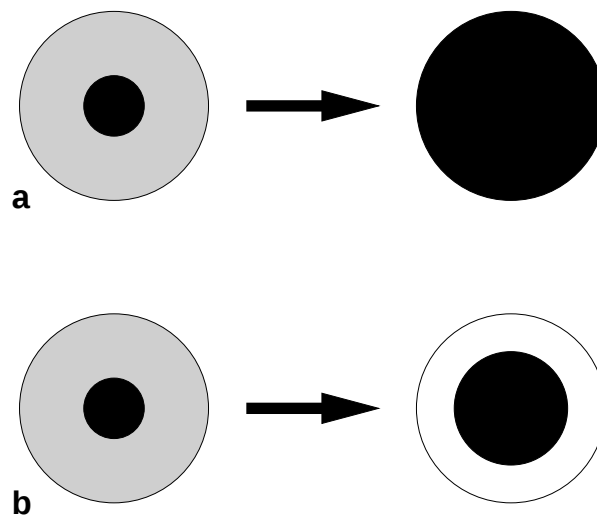


Abbildung 2.2: Schematische Zeichnung der Veränderung der Penumbra. Ohne Intervention kann es zu einer Ausbreitung des Infarktes (schwarz) auf das gesamte Penumbragebiet (grau) kommen (a). Durch die Neuroprotektion erhofft man sich, diese Ausbreitung zu verhindern, so daß ein Teil der Penumbra gerettet wird und somit als intaktes Gewebe (weiß) erhalten bleibt (b). (aus [21])

Das Konzept der Penumbra ist über Untersuchungen über den zerebralen Blutfluß („Cerebral blood flow“, CBF) definiert. Der Verschluß einer Hirnarterie führt zum Auftreten von Regionen mit unterschiedlicher Restdurchblutung und Kompensation durch Kollateralisierung.

Das Konzept der ischämischen Penumbra wurde schon 1977 durch Symon et al. [112] anhand tierexperimenteller Studien belegt. Es konnten zwei Schwellenwerte (sog. „thresholds“) reduzierter Hirndurchblutung definiert werden: bei dem einen Schwellenwert ist der Funktionsausfall, bei dem anderen Schwellenwert die morphologische Schädigung des Nervengewebes die Folge [112]. Gewebazonen mit einem CBF unterhalb des Schwellenwertes für die morphologische Integrität erleiden bei einer fokalen zerebralen Ischämie bereits innerhalb von einer Stunde eine irreversible Zellschädigung mit Untergang aller zellulären Elemente [61]. Dagegen sind Neurone, die zwischen diesen beiden Schwellenwerten angesiedelt sind, zwar „elektrisch“ stumm, bleiben aber eine längere, im Einzelfall unbestimmte Zeit morphologisch intakt [54].

Aufbauend auf diesen Arbeiten führten Astrup et al. [5] und andere Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Modellen an verschiedenen Tierspezies CBF-Messungen durch [5, 82, 86]. Es konnten Schwellenwerte ermittelt werden, die zu Veränderungen der elektrischen Aktivität in Form von evozierten Potentialen und zu Veränderungen der Membranintegrität führten [5]. Obwohl die Schwellenwertmessungen an verschiedenen Tierspezies und unter unterschiedlichen Narkosen und Meßmethoden durchgeführt worden sind, kann dennoch eine gewisse Reihenfolge der Ausfallserscheinungen zusammengestellt werden. Mit abnehmenden Blutflußraten kommt es zunächst zur Hemmung der Proteinsynthese (bei einem CBF-Abfall auf 55 ml/100g/min), gefolgt von der Stimulation der anaeroben Glykolyse (bei einem CBF-Abfall auf 35 ml/100g/min), dem Freiwerden von Neurotransmittern und der allmählichen Störung des Energiemetabolismus (bei einem CBF-Abfall auf 20 ml/100g/min) und schließlich der anoxischen Depolarisation (bei einem CBF-Abfall < 15 ml/100g/min) [54]. Die ischämische Penumbra selbst ist durch eine Abnahme des zerebralen Blutflusses auf Werte um 15-35 ml/100g/min gekennzeichnet [4].

Um den metabolischen Forderungen des Gewebes nachzukommen, ist im gesunden Hirngewebe ein Anstieg im lokalen Glukosebedarf eng gekoppelt mit einem reaktiven Anstieg im lokalen CBF. Dagegen kommt es bei einer zerebralen Ischämie zu einer Entkopplung von Blutflußraten und lokalem Metabolismus, d.h. daß die Blutflußraten nicht in dem Maße ansteigen, wie es von der metabolischen Aktivität des Gewebes gefordert wird. Diese Ent-

kopplung wird als ein wichtiger pathogenetischer Faktor betrachtet, der zur Gefährdung des ohnehin schon kritischen Energiegleichgewichtes in der Penumbra beiträgt [6]. Es konnte aufgezeigt werden, daß das Verhältnis zwischen lokaler Glukoseausnutzung und CBF um das fünffache innerhalb der Penumbra ansteigt [9]. Dabei handelt es sich z.T. ursächlich um Auswirkungen von Periinfarktdepolarisationen. Diese führen zu einem erhöhten Glukoseverbrauch, zur anaeroben Glykolyse und zur Akkumulation von Laktat [6]. Die erhöhten metabolischen und hämodynamischen Forderungen während der Periinfarktdepolarisationen sind wahrscheinlich durch die Aktivierung von ATP-abhängigen Ionenpumpen bedingt [6]. Obwohl in dem Gewebe der Penumbra die energiereichen Phosphate zumindestens z.T. erhalten bleiben [87], wird auf diese Weise die metabolische Situation in der Penumbra beeinträchtigt.

Anhand histopathologischer Studien an Ratten konnte gezeigt werden, daß der Infarktkern zwischen 8 und 12 Stunden nach Verschuß der MCA von der Ischämie derart betroffen ist, daß die Zellen, die sich im ehemals gesunden Areal befanden, irreversibel morphologisch geschädigt worden sind [41].

Der Infarktkern wird schon bald nach dem Ischämieereignis von einer Zone dichter Astrozyten- und Mikrogliazellenaktivierung umsäumt, die die Gewebezone der Penumbra visualisiert [35, 70].

An der Grenze zum Infarkt ist eine Reduktion der Neuronendichte von der Blutflußrate abhängig. Es konnte eine positive Korrelation zwischen der neuronalen Dichte und dem regionalem CBF in verschiedenen Periinfarktregionen an chronischen MCA-Infarkten in Katzen aufgezeigt werden [86]. Der verstreute, einzelne Verlust an Nervenzellen ist wahrscheinlich durch ihre größere Vulnerabilität im Vergleich zu Gliazellen gegenüber der Ischämie bedingt. Die selektiv geschädigten Nervenzellen befinden sich in einer Umgebung mit erhöhten interstitiellen Konzentrationen an exitotoxischen Neurotransmittern, an Laktat, an Kalium und an Wasserstoffionen. Extrazelluläres Glutamat steigt nach der Ischämie in der Penumbra an [6]. Zudem gefährden Sauerstoffradikale die Penumbra. Die freien Radiale treten eher in partiell perfundiertem oder reperfundiertem ischämischen Gewebe als im Ischämiekern auf. Sie entstehen u.a. durch die Aktivierung von polymorphkernigen Leukozyten [42]. Hydroxylradikale und Peroxinitrit aus der Interaktion zwischen Nitritoxid und Superoxid gelten als zwei der meist toxischen Radikalspezies [42]. Falls der größte Anteil der Neurone und Gliazellen diesen Bedingungen unterworfen ist, entwickelt sich aus dem zunächst nur einzelne Zellen betreffenden Schaden ein kompletter Infarkt [6].

Eine zerebrale Ischämie führt zu einer Synthesereduktion der meisten mRNAs und ihren korrespondierenden Proteinen. Doch einige Gengruppen werden erst durch die Ischämie induziert. Zu diesen gehören die Hitzeschockproteine (HSP) und die „immediate early genes“ (IEGs). Die Mitglieder der fos-Familie (c-fos, fosB, fra1, fra2) und der jun-Familie (c-jun, junB, junD) der IEGs werden durch extra- und intrazelluläre Stimuli wie Neurotransmitter, Peptide, Wachstumsfaktoren, zyklisches AMP, Kinasen und Kalzium aktiviert [65]. Untersuchungen zur selektiven Expression von IEGs nach fokaler Ischämie konnten aufdecken, daß sie sowohl im Zentrum des Infarktes, als auch in der von der Ischämie betroffenen Penumbra induziert werden [6]. Auf der Stufe der mRNA konnten IEGs im Ischämiekern nachgewiesen werden [120]. Dagegen sind IEGs auf der Stufe des Proteins immer auf Regionen in einiger Entfernung zum ischämischen Fokus beschränkt. In der Grenzzone des Infarktes wurde ihre anhaltende neuronale Expression bis zum 4. Tag nach dem Insult beschrieben [116].

In schwer ischämischen Hirnarealen transkribieren die Zellen, die zum Untergang verdammt sind, HSP70-mRNA, translatieren es aber nicht in das Hitzeschockprotein selbst. Dagegen werden HSP70-mRNA und HSP70-Protein in Neuronen außerhalb der Infarktgegend translatiert. 60 bis 90 Minuten nach der Ischämie wird das Hitzeschockprotein HSP70 in den Neuronen der Penumbra induziert [50]. So kann die Ausdehnung der neuronalen HSP70-Proteininduktion dazu genutzt werden, eine „Penumbra“ der Streßgeninduktion, die den Ischämiekern umgibt, zu definieren [108]. Man nimmt an, daß das HSP70 in der Lage ist, denaturierte Proteine zu binden und Zellen zu einer ansteigenden Resistenz gegenüber der Ischämie zu verhelfen [65].

2.4 Fokale Ischämie - Die MCAO als Läsionsmodell

Man unterscheidet zwei Formen der zerebralen Ischämie: die globale und die fokale zerebrale Ischämie. Bei der globalen Ischämie handelt es sich um ein Modell für den vorübergehenden Herzstillstand mit anschließender Reperfusion [111]. Diese hat einen selektiv neuronalen Schaden in verschiedenen Hirnregionen [98] und einen sog. „delayed neuronal death“ [66], also verzögerten Zelltod, zur Folge. Bei der fokalen Ischämie dagegen handelt es sich um ein Modell für den ischämischen Schlaganfall durch den Verschluß eines Gefäßes mit anschließender Entwicklung eines pannekrotischen Infarktkerns und einer Penumbrazone. Um eine fokale zerebrale Ischämie bzw. den Verschluß der MCA zu erzeugen, sind verschiedene Modelle entwickelt worden: der permanente Verschluß der MCA mittels Unterbindung, Gefäßklip oder Elektrokoagulation (nach Tamura et al., 1981, [113]), das Modell der Photothrombose mit Hilfe des intravenös applizierten Farbstoffs Rose Bengal und einer Kaltlichtquelle (nach Watson et al., 1985, [119]), das „Fadenmodell“ anhand eines über einen Katheter vorgeschobenen Fadens (nach Memezawa et al., 1992, [84]) und das Embolienmodell durch die Injektionen von Mikrosphären oder autologem Thrombusmaterial in die A. carotis interna (nach Overgaard et al., 1992 [92]) [18]. Durch das MCAO-Modell nach Tamura et al. lassen sich komplette Mediainfarkte erzeugen, die nur eine geringe Variabilität zwischen den einzelnen Versuchstieren aufweisen. Der Nachteil dieses Modells liegt darin, daß es sich durch das Freilegen und Durchtrennen des M. temporalis und der Osteotomie chirurgisch aufwendig und schwierig gestaltet. Bei dem MCAO-Modell nach Watson et al. lassen sich die Hirninfarkte an einen bestimmten Ort knüpfen, indem die Kaltlichtquelle, die Licht einer bestimmten Wellenlänge abgibt, auf die intakte Schädelkalotte aufgesetzt und durch das Zusammentreffen des Farbstoffs und des Lichtes eine intravasale Thrombose produziert wird. Das MCAO-Fadenmodell nach Memezawa et al., bei dem ein Faden über einen Führungskatheter in die A. carotis communis und die A. carotis interna bis zum Abgang der A. cerebri media vorgeschoben wird, wurde in dieser Arbeit gewählt, um den Infarkt im Mediastromgebiet zu erzeugen. Mit diesem Modell können die Ischämiedauer und die resultierenden Infarktvolumina variiert und eine Reperfusion angeschlossen werden. Das MCAO-Modell nach Overgaard et al. imitiert durch das Embolieereignis zwar die Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls am besten, doch der Nachteil dieses Modells besteht darin, daß die resultierenden Infarktmuster eine sehr große Streubreite in Bezug auf Größe und Lokalisation des Infarktes aufweisen [18].

2.5 Fragestellung

Obwohl sich das größte Ausmaß des Gewebeschadens innerhalb der ersten Stunden nach der zerebralen Ischämie entwickelt, so hat es sich dennoch etabliert, daß die Penumbra zu einem späteren Zeitpunkt eine Verschlechterung erfährt. Da auch klinische Studien ein Penumbrakorrelat beim Patienten nach einem Schlaganfallereignis identifizieren konnten [51], besteht ein besonderes Interesse, die pathophysiologischen Prozesse innerhalb der ischämischen Penumbra in ihren chronologischen und topographischen Abläufen und in ihrer Morphologie besser verstehen zu lernen.

Es stellt sich die Frage, inwieweit eine postischämische Inflammation und eine zelluläre Infiltration zu einer weiteren Schädigung der Penumbra beitragen. Deshalb wurden in dieser Arbeit verschiedene immunhistochemische Marker für die Inflammation und für den neuronalen Zelltod über einen relativ langen Zeitraum von zwei Wochen untersucht.

2.5.1 Wie ist die Dynamik der Zytokinexpression in der Penumbra?

Es ist noch wenig untersucht, inwieweit und über welchen Zeitraum Zytokine in der Penumbra synthetisiert werden. Anhand im Tierversuch erzeugter Infarkte im Mediastromgebiet, die von einer ischämischen Penumbra umgeben sind, soll in dieser Arbeit ein Blick auf die Dynamik der Expression der repräsentativen proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α geworfen werden. Eine über die Akutphase der Ischämie hinaus bestehende Entzündungsreaktion in der Penumbra würde auf länger anhaltende dynamische Veränderungen hinweisen.

2.5.2 Gibt es einen zeitlichen Zusammenhang zwischen Zytokinexpression und neuronalem Zelltod in der Penumbra?

In dieser Arbeit wurde der neuronale Zelltod mit Hilfe der immunhistochemischen Marker n-NOS und TUNEL und mit Hilfe von Nisslfärbungen in der Penumbra detektiert. Es stellt sich die Frage, ob ein möglicher zeitlicher Zusammenhang zwischen Zytokinexpression und neuronalem Zellschaden in der Penumbra, sei es in Form von Nekrose oder Apoptose, besteht. Ein möglicher zeitlicher Zusammenhang könnte auch wegweisend für einen kausalen Zusammenhang und damit für eine Erklärung der Abläufe in der ischämischen Penumbra sein.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Mit Genehmigung der zuständigen Tierversuchskommission (Regierungspräsidium Köln) und unter der Aufsicht des zuständigen Veterinäramtes (Aachen) wurden die Experimente durchgeführt. Es wurden männliche *Sprague Dawley* Ratten mit einem Gewicht von 220 bis 250 g und einem Alter von 3 bis 4 Monaten verwendet.

Die Tiere wurden im Institut für Versuchstierkunde der RWTH-Aachen gezüchtet und gehalten (konventioneller Keimstatus; Makrolon-Käfige Typ 3; Einstreu: entstaubte Weichholzfaser; Futter: Alleindiät RM 204¹; Tränke: durch zweimalige Ozonierung und Ansäuerung (pH 4-5) keimfreies Wasser in Makrolon-Tränkflaschen; Futter und Wasser ad libitum; Temperatur in den Tierräumen: $20 \pm 2^\circ\text{C}$; rel. Luftfeuchte: $60 \pm 10\%$; hell/dunkel Rhythmus: 12:12 h).

3.2 Operation und Perfusion

Die Operation der Tiere wurde in Halothan-Narkose durchgeführt (2 % Halothan in 30 % O_2 /70 % N_2O).

Bei den Tieren wurde durch das sog. „Fadenmodell“ [79, 84, 19, 20] eine fokale zerebrale Ischämie durch Verschluss der Arteria cerebri media (MCA) induziert. Es wurde eine Inzision in der ventralen Halsmittellinie in Rückenlage der Tiere durchgeführt, um die rechte A. carotis communis, A. carotis externa und A. carotis interna freizulegen. Die distale A. carotis communis und die distale A. carotis externa wurden mit einer

¹Fa. Eggersmann, Rinteln

4-0er-Naht ligiert. Die A. pterygopalatina wurde mit einem Faden nur umschlungen. Ein 4-0er Monofilament-Nylon-Faden (45 mm lang, ein Ende Poly-L-Lysin-beschichtet [14]) wurde in einen Führungskatheter (30 mm lang) eingeführt. Nach Arteriotomie der rechten A. carotis communis wurden Faden mit Führungskatheter in die A. carotis interna bis 17 mm distal der Karotisbifurkation vorgeschoben. Leichter Widerstand bedeutete, daß der Faden die A. cerebri anterior erreicht hatte und so der Verschluß der A. cerebri media erreicht war (Abb. 3.1).

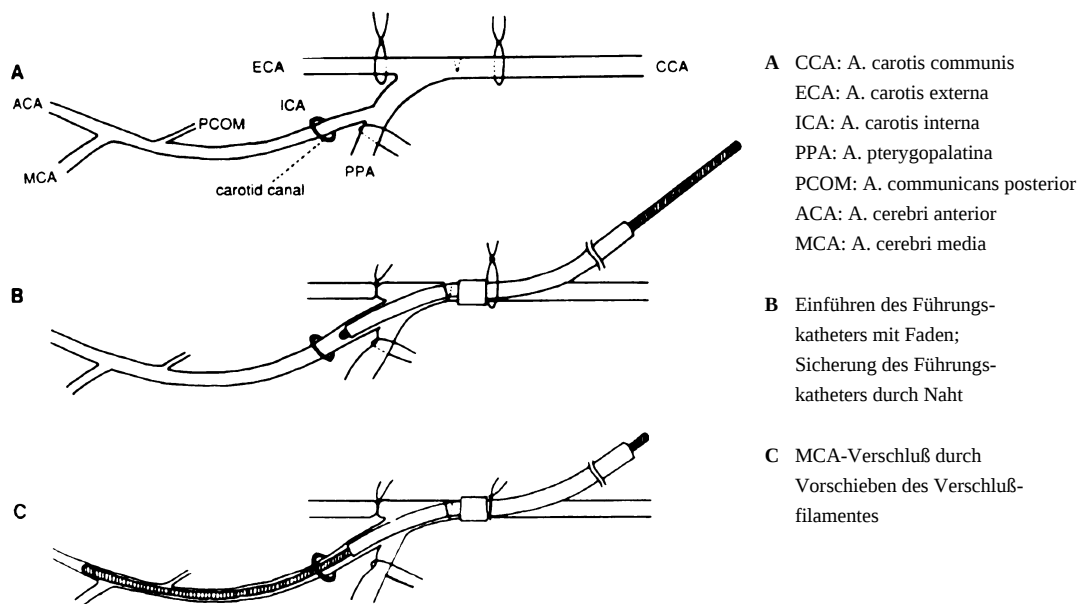


Abbildung 3.1: Anatomische Skizze der Karotiden und Prozedur des Verschlusses der MCA für die Ratte (aus [84])

Um eine Reperfusion 3 Stunden später herbeizuführen, wurden Katheter und Faden entfernt. Die A. carotis communis wurde nach Herausziehen des Katheters herzwärts der Arteriotomie ligiert, die Umschlingung der A. pterygopalatina entfernt und die Wunde durch Naht verschlossen. Der Zustand der Tiere wurde täglich kontrolliert.

Als Kontrolltiere dienten 4 scheinoperierte Ratten, die derselben Prozedur wie oben beschrieben ausgenommen des Verschlusses der MCA unterzogen wurden. Anstelle eines 45 mm langen 4-0er Monofilament-Nylon-Fadens wurde ein 15 mm langer Faden in den Führungskatheter eingeführt.

Die Überlebenszeiten der Tiere betrugen 1, 3, 7 und 14 Tage; pro Überlebenszeitpunkt wurden jeweils 3-4 Ratten untersucht.

Nach entsprechender Überlebenszeit wurden die Tiere in tiefer Pentobarbital-Narkose transkardial perfundiert. Das Herz wurde freipräpariert, das rechte Atrium aufgeschnitten und ein Katheter in den linken Ventrikel plaziert. Mit 50 ml einer 0,9 % igen Kochsalzlösung wurde vorgespült und mit 400 ml einer 4 % igen Paraformaldehydlösung in 0,1 M phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (0,1 M PBS, pH 7,4) fixiert. Anschließend wurden die Gehirne entnommen.

3.3 Weiterverarbeitung und Färbemethoden

Nach Entnahme der Hirne wurden sie für 2 Stunden bei 4 °C in 4 % ige Paraformaldehydlösung (0,1 M PBS, pH 7,4) zur weiteren Fixierung gelegt. Es erfolgte eine Kryoprotektion für 2 bis 3 Tage in 30 % iger Saccharose ² in 0,1 M PBS bei 4 °C. Anschließend wurden die Hirne in Isopentan bei -80 °C tiefgefroren und gelagert.

Mit einem Kryostaten³ wurden für die immunhistochemischen Färbungen, die TUNEL-Färbungen und die NISSL-Färbungen 20 µm dicke Frontalschnitte hergestellt und nach der Free-floating-Methode in 0,1 M PBS (pH 7,4) in MULTIWELL-Gewebekulturplatten aufgefangen. Der Vorteil der Free-floating-Technik gegenüber der Arbeit mit Paraffinschnitten bestand in der besseren Zugänglichkeit des Gewebes für die sich in Lösung befindenden Antikörper.

Unter Zuhilfenahme des Hirnatlas der Ratte von Paxinos und Watson [94] wurden in zwei definierten Ebenen (von 1,2 mm bis 0,7 mm (Striatumebene) und von -1,8 mm bis -2,3 mm (Thalamusebene) post Bregma) fortlaufende Hirnschnitte angefertigt.

3.3.1 Färbemethoden zur immunhistochemischen Darstellung von IL-1 β , IL-6, TNF- α , i-NOS, n-NOS, GFAP und OX 42

3.3.1.1 Avidin-Biotin-Methode

Die Immunhistochemie wurde nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode⁴ durchgeführt. Diese Technik nützt die starke Affinität von Avidin für Biotin. Das Verfahren benötigt einen biotinylierten Zweitantikörper, wobei Biotin kovalent an den Antikörper gebunden wird.

²Merck, 107687-1000

³Leica, CM 3050

⁴Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories

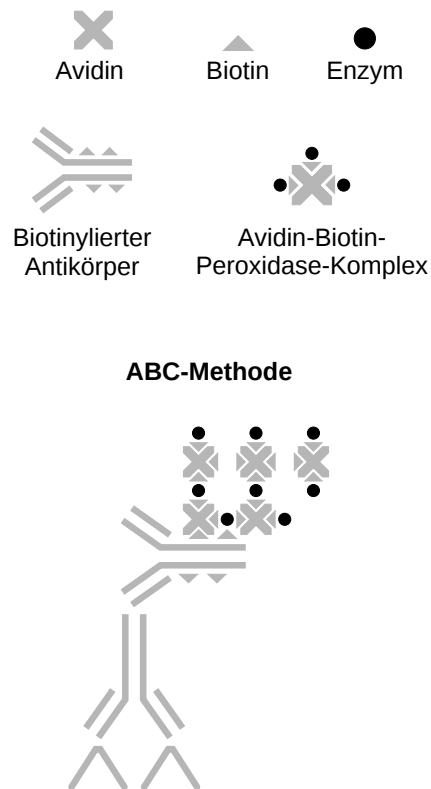


Abbildung 3.2: Avidin-Biotin-Methode: vorgeformte Avidin-Biotin-Enzymkomplexe (ABC) reagieren mit biotinylierten Sekundärantikörpern (aus [34])

Die Reihenfolge der Reagenzien-Applikation war wie folgt: Primärantikörper, biotinylierter Zweitantikörper, vorgeformter Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC), Substratlösung. Als Enzym wurde Meerrettichperoxidase verwendet (Abb. 3.2).

3.3.1.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Zunächst wurden die Kryostatschnitte mit einer Lösung aus 3 % igem H_2O_2 (aus 30 % igem H_2O_2 ⁵), 50 % igem Methanol und 50 % igem PBS (0,1 M PBS, pH 7,4) für 10 Minuten behandelt, um die endogene Peroxidase zu blocken und um somit unspezifischen Gewebereaktionen entgegenzuwirken.

Nach 3 maligem Waschen in 0,1 M PBS für je 3 Minuten wurde mit einer Lösung aus 0,3 % igem Triton-X-100⁶ in PBS und 10 % igem Normalserum für 10 Minuten inkubiert, um unerwünschten Kreuzreaktionen des sekundären Antikörpers mit endogenen Immunglobulinen im Material vorzubeugen. Bei IL1- β , TNF- α , GFAP und OX 42 wurde

⁵Aldrich, 216763

⁶Sigma

normales Pferdeserum (Horse Normal Serum, HNS) ⁷ und bei IL-6, i-NOS und n-NOS wurde normales Ziegen Serum (Goat Normal Serum, GNS) ⁸ verwendet. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C in einer Lösung aus 0,5 % igem Triton in PBS, 1 % igem Normalserum und dem jeweiligen Primärantikörper (Tabelle 3.1).

Primär-antikörper	IL-1 β	IL-6	TNF- α	i-NOS	n-NOS	GFAP	OX 42
verwendetes Normalserum	HNS (1 %)	GNS (1 %)	HNS (1 %)	GNS (1 %)	GNS (1 %)	HNS (1 %)	HNS (1 %)
Antikörper-Verdünnung	7,5:1000	1:100	7,5:1000	1:1000	1:5000	1:250	1:5000
Spezifikation	Polyklonales Ziegen-immunglobulin gegen Ratten-IL-1 β , Fa. R&D, AF-501-NA	Polyklonales Kaninchen-immunglobulin gegen Ratten-IL-6, Fa. Biozol, Eching	Polyklonales Ziegen-immunglobulin gegen Ratten-TNF- α , Fa. R&D, AF-510-NA	Polyklonales Kaninchen-immunglobulin gegen Ratten-i-NOS, Fa. Upstate, 06-295	Polyklonales Kaninchen-immunglobulin gegen Ratten-b-NOS, Fa. Euro-Diagnostika B220-1	Monoklonales Mäuse-immunglobulin gegen Ratten-GFAP, Fa. Boehringer Mannheim, 814 369	Monoklonales Mäuse-immunglobulin gegen Ratten-OX 42, Fa. Serotec, MCA275G

Tabelle 3.1: Primärantikörper mit Angaben zum verwendeten Normalserum, zur Antikörperverdünnung und zur Spezifikation

Nach der Inkubation über Nacht bei 4 °C erfolgte 3 minütiges 3 maliges Waschen in 0,1 M PBS. Im sich anschließenden Schritt wurde der Sekundärantikörper zugegeben. Die Inkubation bei Raumtemperatur betrug 1 Stunde.

Dabei wurde für IL-1 β und TNF- α Pferd-Anti-Ziegen-IgG⁹ in einer Verdünnung von 1:1000 mit 2 % igem normalen Rattenserum (Rat Normal Serum, RNS) ¹⁰ und 1 % igem HNS in 0,1 M PBS verwendet.

IL-6, i-NOS und n-NOS wurden mit Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG¹¹ in der Verdünnung von 1:1000 mit 2 % igem RNS und 1 % igem GNS in 0,1 M PBS behandelt.

GFAP und OX 42 wurden mit Pferd-Anti-Maus-IgG¹² in der Verdünnung von 1:500 mit 2 % igem RNS und 1 % igem HNS in 0,1 M PBS inkubiert.

Anschließend erfolgte wiederum 3 maliges Waschen in PBS. Im folgenden Schritt wurden die Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex¹³ für 30 min bei Raumtempera-

⁷HNS, Vector, S-2000

⁸GNS, Sigma, G-9023

⁹Horse-anti-Goat, Vector Laboratories, BA-9500

¹⁰RNS, Sigma, R-9759

¹¹Goat-anti-Rabbit, Vector Laboratories, BA-1000

¹²Horse-Anti-Mouse, Vector Laboratories, BA-2001

¹³Elite Standard, Veca Stain, PK 6100

tur behandelt. Nach erneutem 3 maligen Waschen mit 0,1 M PBS erfolgte die Entwicklung in 5 mg Diaminobenzidin¹⁴ und 20 μ l 3 % igem H_2O_2 in 10 ml DAB-Diluent¹⁵ unter Mikroskopkontrolle.

Nach einer letzten Spülung mit 0,1 M PBS wurden die Schnitte auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen und in 50 und 100 % igem Ethylalkohol entwässert. Nach Lufttrocknung wurden die Schnitte schließlich in DePeX¹⁶ eingebettet.

Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde überprüft, indem die Hirnschnitte unter Auslassung des jeweiligen Primärantikörpers und ansonsten wie oben beschrieben immunhistochemisch aufgearbeitet wurden. Sowohl in den Hirnschnitten der Kontrolltiere als auch der MCAO-Ratten ohne Verwendung des Primärantikörpers konnte zu keinem Zeitpunkt für keinen Antikörper eine spezifische Anfärbung von Zellen beobachtet werden.

3.3.2 Färbemethode zur Darstellung von TUNEL

3.3.2.1 TUNEL-Methode

Hinter TUNEL verbirgt sich die Abkürzung für „TdT-mediated dUTP nick end labeling“. Das Prinzip der Färbung besteht darin, daß die durch DNA-Strangbrüche freigewordenen 3'-OH-Enden durch modifizierte Nukleotide in einer enzymatischen Reaktion identifiziert werden können. Dies bewirkt die TdT, die terminale Desoxynukleotid-Transferase, durch Polymerisation von Nukleotiden an freien 3'-OH DNA-Enden. Es wird gleichzeitig Fluoreszein miteingebaut. Durch die Zugabe von Antifluoreszein-Antikörpern vom Schaf, welche mit Meerrettichperoxidase (POD) konjugiert sind und an das Fluoreszein binden, können durch die Zugabe des Substrates H_2O_2 für die POD die betroffenen Zellen lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

3.3.2.2 Durchführung der TUNEL-Färbung

Die Kryostatschnitte mit einer Dicke von 20 μ m wurden in einer Lösung aus 3 % igem H_2O_2 (aus 30 % igem H_2O_2), 50 % igem Methanol und 50 % igem PBS (0,1 M, pH 7,4) für 10 Minuten inkubiert, um wiederum die endogene Peroxidase zu blocken und um somit Unspezifitäten der Färbung entgegenzuwirken. Darauf folgte eine 3 malige Waschung in 0,1 M PBS für jeweils 3 Minuten. Nun wurden die Schnitte für 2 Minuten mit einer

¹⁴Sigma, D-5637

¹⁵DAB-Diluent: NaH_2PO_4 80 g + Imidazole 13,5 g (pH 6,5), Verdünnung 1:10

¹⁶Fluka, 44581

Lösung aus 0,1 % igem Triton-X-100 in 0,1 % igem Natriumzitatrat bei 4 °C behandelt. Nach anschließender 3 maliger Waschung in 0,1 M PBS erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde mit der Enzymlösung TdT und der Nukleotidmischung aus dem TUNEL-Kit¹⁷ bei 37 °C im Wärmeschrank.

Nach anschließendem 3 maligen Waschen der Schnitte wurde der Konverter-POD zugegeben, ein Antifluoreszein-Antikörper vom Schaf, der mit der Meerrettichperoxidase (POD) konjugiert ist. Es wurde wiederum für eine Stunde bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach erneutem 3 maligen Waschen mit 0,1 M PBS erfolgte die Entwicklung unter Mikroskopkontrolle in 5 mg Diaminobenzidin und 20 µl 3 % igem H₂O₂ in 10 ml DAB-Diluent, das Aufziehen der Schnitte auf Gelatine-beschichtete Objektträger, die Entwässerung mit Ethylalkohol und die Einbettung der Schnitte wie in Abschnitt 3.3.1.2 schon beschrieben.

3.3.3 Färbemethode zur Darstellung von NISSL

3.3.3.1 NISSL-Methode

Thionin ist ein basischer Farbstoff, der an die ribosomale RNA (rRNA), konkret an die Phosphatreste der Nukleotide, bindet. Somit färbt sich das rauhe endoplasmatische Retikulum, bestehend aus endoplasmatischem Retikulum (ER) und Ribosomen, im Zytoplasma an. Außerdem kommt es zur Darstellung des Nukleolus im Zellkern, da dort die rRNA hergestellt wird.

In der Nervenzelle wird nur das Perikaryon und die somanahen Dendritenabschnitte, nicht jedoch das Axon angefärbt, da sich das rauhe ER bei der Nervenzelle auf den Zelleib beschränkt.

So kommt es lichtmikroskopisch zur Darstellung zahlreicher grober, unregelmäßig geformter Teilchen, der sog. Nissl-Schollen, im Perikaryon der Nervenzelle.

3.3.3.2 Durchführung der NISSL-Färbung

Die mit dem Kryostaten angefertigten 20 µm dicken Schnitte wurden zunächst auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Danach erfolgte eine 4 minütige Spülung in Na-Acetat-Puffer (0,1 M, pH 4,6). Es schloß sich die eigentliche Färbung in einer 0,04 % igen Thioninlösung¹⁸ in Na-Acetat-Puffer (pH 4,6) für 10 Minuten an. Nach einer erneuten Spülung in Na-Acetat-Puffer wurden die Schnitte in einer

¹⁷In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Mannheim Boehringer, 1684817

¹⁸Sigma, T-3387

aufsteigenden Alkoholreihe aus 50 % igem, 70 % igem und 96 % igem Ethylalkohol differenziert, wobei sie für jeweils 5 Minuten im jeweiligen Alkohol verblieben. Durch eine weitere Entfärbung in 5 % iger Cajput-Öl-Lösung¹⁹ in 96 % igem Ethanol wurde das Gewebe unter optischer Kontrolle durchsichtiger. Es folgte eine 2 malige Entwässerung in 100 % igem Ethylalkohol für jeweils 2,5 Minuten.

Die Schnitte wurden an der Luft getrocknet und in DePeX eingebettet.

3.4 Auswertung

Für die Auswertung wurden die Bilder der Schnitte über eine an ein Mikroskop²⁰ angeschlossene Kamera bei entsprechender Vergrößerung in ein computerunterstütztes Bildverarbeitungssystem²¹ eingeladen.

Zur Verdeutlichung des weiteren Ganges der Auswertung zeigt die Abbildung 3.3 einen Ausschnitt aus einem schematischen Hirnschnitt. Es sind auf der linken Seite der durch die Ischämie geschädigte Kortex und auf der rechten Seite der kontralaterale gesunde Kortex dargestellt. Der geschädigte Kortex ist in drei verschiedene Gewebezonen eingeteilt: in die Zone des Infarktes (schwarz, A), in die Zone der Penumbra (dunkelgrau, B) und in die Zone des gesunden Gewebes (weiß, C). Diese drei Zonen werden im folgenden für die Auswertung innerhalb der verschiedenen Zellzählgebiete von besonderem Interesse sein.

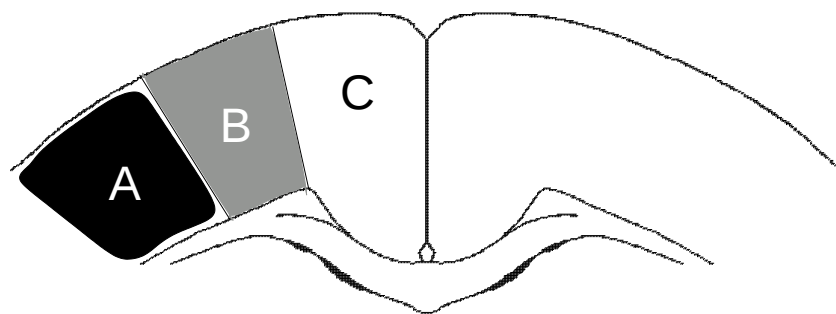


Abbildung 3.3: Schematische Zeichnung des ischämischen (links) und des gesunden (rechts) Kortex eines Hirnschnittes mit den verschiedenen Gewebezonen: Zone des Infarktes (A), Zone der Penumbra (B), Zone des gesunden Gewebes (C)

Neben den oben beschriebenen drei Zonen wurde noch eine weitere vierte Gewebezone

¹⁹Sigma, 7517

²⁰Zeiss Axioplan

²¹Ippus 2.0

untersucht. Die Abbildung 3.4 verdeutlicht, wo diese vierte Zone, die sog. „Spiegelbildpenumbra“, im kontralateralen gesunden Kortex anzusiedeln ist: die hellgraue Gewebezone (D) stellt die „Spiegelbildpenumbra“ dar, welche durch Ausmessung wie ein Spiegelbild auf den kontralateralen gesunden Kortex projiziert werden konnte. Der Kortex ist nicht in allen Gewebeschichten durch eine gleiche Neuronendichte gekennzeichnet. Die einzelnen Kortexschichten sind durch einen unterschiedlichen Zellaufbau definiert. Die „Spiegelbildpenumbra“ wurde ausgezählt, um diesem Umstand gerecht zu werden. Zudem sollte untersucht werden, ob eine eventuelle Reduktion der Neuronendichte in der Penumbra des ischämischen Kortex nicht etwa durch eine ungleiche anatomisch-physiologische Verteilung der Nervenzellen im Kortex bedingt sein könnte. Auf diese Weise sollte eine mögliche Reduktion der Nervenzellen in der Penumbra aufgedeckt und der Frage nachgegangen werden, ob die Anzahl der Nervenzellen in der „Spiegelbildpenumbra“ der Anzahl der Nervenzellen im gesunden Gewebe des ischämischen Kortex weitgehend entspricht.

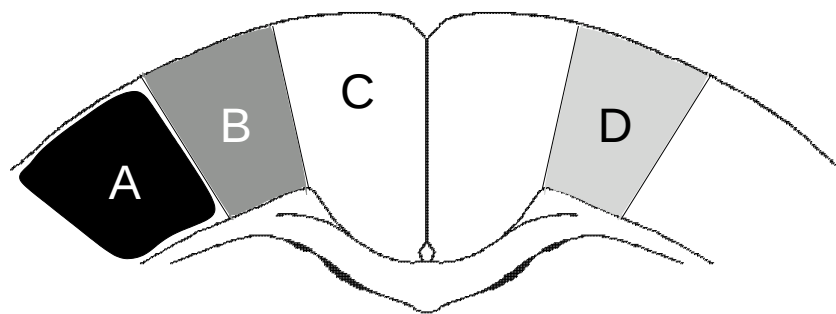


Abbildung 3.4: Schematische Zeichnung des ischämischen (links) und gesunden (rechts) Kortex eines Hirnschnittes mit den verschiedenen Gewebезonen: Zone des Infarktes (A), Zone der Penumbra (B), Zone des gesunden Gewebes (C), Zone der „Spiegelbildpenumbra“ (D)

3.4.1 Läsionsidentifikation im ischämischen Kortex anhand der NISSL-Färbung

Anhand der NISSL-Färbung wurde die Läsion im Kortex identifiziert und so sichergestellt, daß durch die Operation auf der Ebene des Striatums (1,2 mm bis 0,7 mm post Bregma) und auf der Ebene des Thalamus (-1,8 mm bis -2,3 mm post Bregma) ein Infarkt durch den Verschluß der A. cerebri media herbeigeführt worden ist.

3.4.2 Ausmessung der Penumbra im ischämischen Kortex

Vor dem Hintergrund verschiedener Untersuchungen, die zeigten, daß die Expression von GFAP in der Infarktregion verschwindet und im Periinfarktgebiet ansteigt [33, 35, 31], wurde auf der Ebene des Striatums und auf der Ebene des Thalamus mit Hilfe der GFAP-Färbung die breiteste und die schmalste Stelle der Penumbra im Kortex ermittelt. Dies geschah konkret, indem lichtmikroskopisch das Band der sich für GFAP-positiv anfärbenden Astrozyten betrachtet und ausgemessen wurde. Es wurde an jeweils 3 Schnitten bei jeweils 3 Tieren zu allen Überlebenszeiten bei 200facher Vergrößerung ausgemessen. Die minimale Weite der Penumbra betrug $500\text{ }\mu\text{m}$, die maximale $720\text{ }\mu\text{m}$. So entstand in der vorliegenden Arbeit eine Definition der Penumbra anhand der GFAP-Färbung.

Auf diese Weise konnte in unserem Fall sichergestellt werden, daß man für die semiquantitative Auswertung mit einem Zählquadrat mit einer Fläche von $200\times 200\text{ }\mu\text{m}^2$ sicher in der durch die GFAP-Färbung definierten Penumbrazone liegen wird.

3.4.3 Semiquantitative Auswertung der Anzahl von IL-1 β , IL-6, TNF- α , i-NOS, n-NOS, TUNEL und NISSL positiven Zellen im ischämischen Kortex und der NISSL positiven Zellen in der „Spiegelbildpenumbra“

Für die semiquantitative Auswertung wurden für die Überlebenszeiten 1 Tag, 3 Tage, 7 Tage und 14 Tage jeweils 3 Tiere mit jeweils 3 Schnitten auf den Ebenen des Striatums und des Thalamus herangezogen. Es wurden im Infarktgebiet, in der Penumbra und im gesunden Areal des ischämischen Kortex die lichtmikroskopisch als positiv für die Marker IL-1 β , IL-6, TNF- α , i-NOS, n-NOS, TUNEL und NISSL und in der „Spiegelbildpenumbra“ die lichtmikroskopisch als positiv für NISSL zu identifizierenden Zellen mit dem oben erwähnten Zählquadrat ($200\times 200\text{ }\mu\text{m}^2$) bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Die NISSL-Zählungen im ischämischen Kortex und in der „Spiegelbildpenumbra“ beschränkten sich auf die Überlebenszeit 14 Tage. Für die statistische Auswertung wurde der Mittelwert positiver Zellen je Überlebenszeitpunkt (1 d, 3 d, 7 d, 14 d), Zählgebiet (Infarkt, Penumbra, gesundes Gewebe, „Spiegelbildpenumbra“), Ebene (Striatum, Thalamus) und Marker (IL-1 β , IL-6, TNF- α , i-NOS, n-NOS, TUNEL, NISSL) bestimmt. Weiterhin wurden die zugehörigen S.E.M.-Werte ($\text{Std.abw.}/\sqrt{n}$) ermittelt. Zudem wurde eine statistische Analyse (Student's T-Test) der Zelldichten sowohl in der Ebene des Striatums als auch in der

des Thalamus zwischen Penumbra und „Spiegelbildpenumbra“ bzw. der an die Penumbra angrenzenden Kortexregion mit unbeschädigtem Gewebe für die NISSL-Färbungen am 14. postischämischen Tag durchgeführt.

3.4.4 Dichtemessungen

3.4.4.1 Auszählung der positiven Zellen im Infarktareal des ischämischen Kortex

Alternierend wurden im ischämischen Kortex ab der Mantelkante jeweils 2 Quadrate im Infarktgebiet ausgezählt und 2 Quadrate übersprungen (Abb. 3.5).

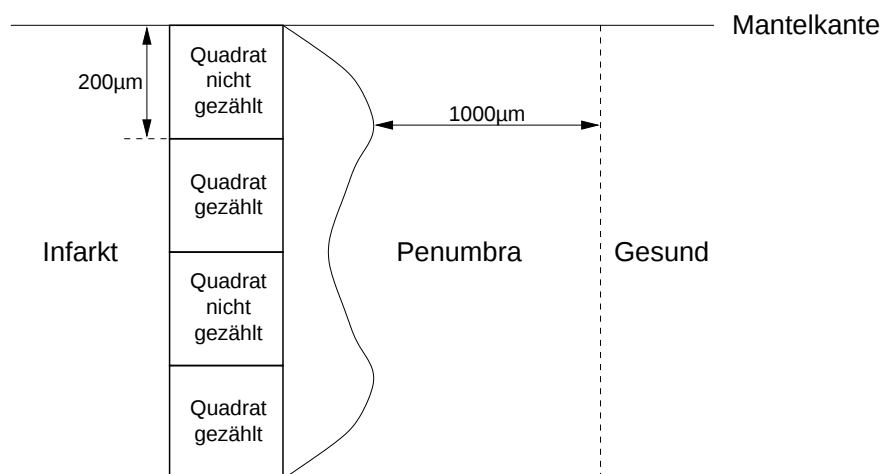


Abbildung 3.5: Auszählung der positiven Zellen im Infarktareal im ischämischen Kortex

3.4.4.2 Auszählung der positiven Zellen in der Penumbra des ischämischen Kortex

Wiederum wurden alternierend im ischämischen Kortex ab der Mantelkante jeweils 2 Quadrate ausgezählt und 2 Quadrate übersprungen (Abb. 3.6).

3.4.4.3 Auszählung der positiven Zellen im gesunden Gewebe des ischämischen Kortex

Bei der Auszählung des gesunden Gewebes wurde von dem am weitesten in die Penumbra reichenden Infarktareal im Kortex $1000\ \mu\text{m}$ in Richtung gesundes Gebiet abgemessen. Durch die Ausmessung der Penumbra, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, konnte man einen $1000\ \mu\text{m}$ großen Abstand vom Rand des Infarktgebietes zum Beginn des gesunden

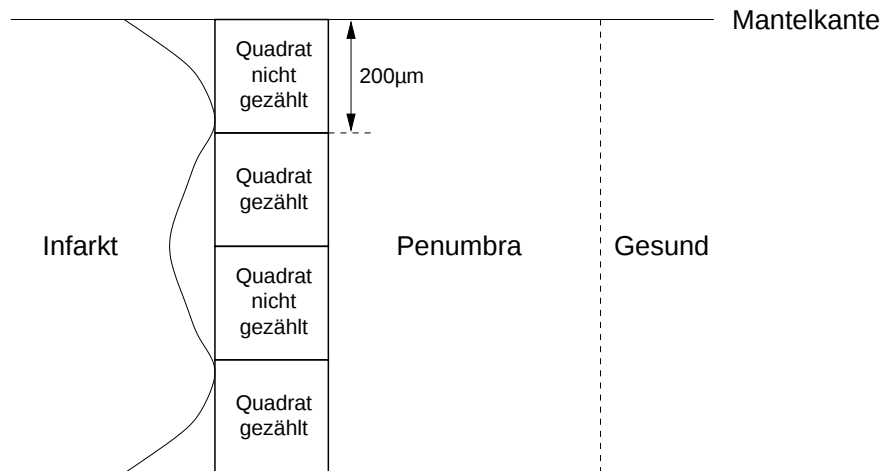


Abbildung 3.6: Auszählung der positiven Zellen in der Penumbra im ischämischen Kortex

Areale als ausreichend identifizieren, daß man sich im gesunden Gebiet des ischämischen Kortex befand. Dort wurde die Zählung ebenso wie oben beschrieben durchgeführt (Abb. 3.7).

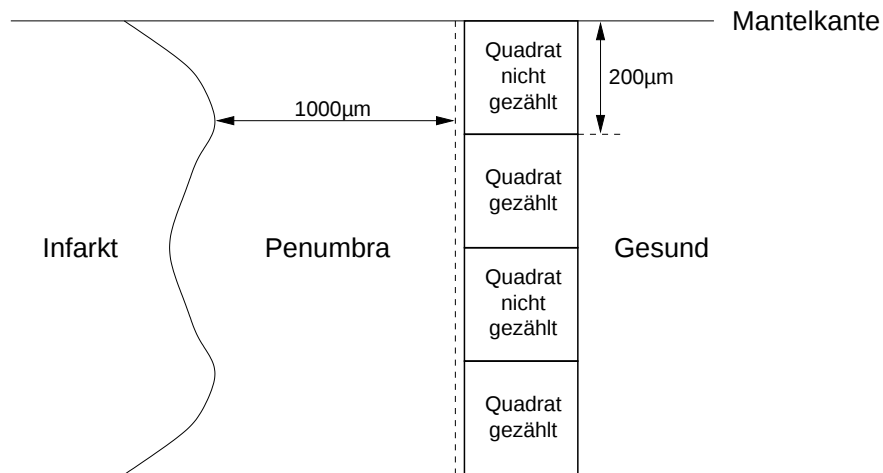


Abbildung 3.7: Auszählung der positiven Zellen im gesunden Gewebe im ischämischen Kortex

3.4.4.4 Auszählung der „Spiegelbildpenumbra“ im kontralateralen gesunden Kortex

Ebenso wie oben beschrieben wurde in der sog. „Spiegelbildpenumbra“ im kontralateralen gesunden Kortex alternierend ab der Mantelkante jeweils 2 Quadrate ausgezählt und 2 Quadrate übersprungen.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Infarktmuster im zeitlichen Verlauf anhand der NISSL-Färbung

Die durch den transienten Verschuß der rechten A. cerebri media erzeugte fokale zerebrale Ischämie führt zu einem Infarkt im lateralen und medialen Striatum und im angrenzenden Kortex der rechten Hemisphäre.

1 Tag nach der Reperfusion kommt es zu einer deutlich blässeren Anfärbung großer Anteile des rechten Kortex und nahezu des ganzen rechten Striatums bedingt durch die Schädigung aller Zellen, die sich im Infarktbereich befinden. Der Restgewebsverband ist noch weitgehend erhalten. Es zeigt sich eine Anschwellung des Striatums und des Kortex der von der Ischämie betroffenen Hemisphäre, die den rechten Seitenventrikel diskret einengt.

Am 3. Tag nach der Reperfusion hat die Resorption des geschädigten Gewebes eingesetzt. Das Gewebe erscheint zerrissen und in Auflösung begriffen. Der Gewebeabbau setzt sich bis zum 7. postoperativen Tag fort und findet seinen Höhepunkt am 14. Tag in einer vollständigen Kolliquationsnekrose. Die Pannekrose betrifft das laterale Striatum, Teile des medialen Striatums, den piriformen, insularen und Teile des parietalen Kortex. Die Penumbra entwickelt sich im frontalen bis frontoparietalen Kortex.

Auf der Ebene des Thalamus zeigt sich eine ähnliche kortikale Entwicklung des Gewebeschadens.

Folglich ergibt sich mit der Zunahme der Überlebenszeit der Tiere (1d, 3d, 7d bis 14d) nach der Ischämie sowohl auf der Ebene des Striatums (1,2mm bis 0,7mm post

Bregma) als auch auf der Ebene des Thalamus (-1,8 mm bis -2,3 mm post Bregma) ein ausgedehnter Gewebeverlust im Mediastromgebiet, dessen Endzustand sich in Abb. 4.1 14 d postoperativ in der NISSL-Färbung darstellt. Nur noch ein kleiner medialer Anteil des Striatums und des Kortex ist im Vergleich zur kontralateralen Kontrollseite erhalten geblieben.

In der kontralateralen gesunden Hemisphäre kann keine ischämische Gewebezone ausgemacht werden.

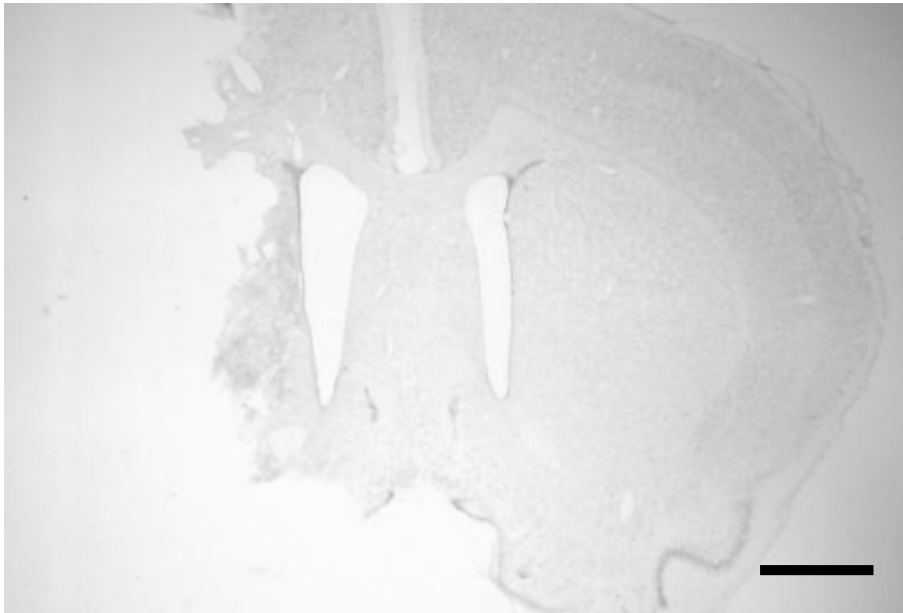


Abbildung 4.1: Frontalschnitt in der Striatumebene, 14 d postop. , NISSL-Färbung, 4fache Vergrößerung. Die NISSL-Färbung zeigt die Infarktareale im Striatum und im Kortex (links) und die gesunde kontralaterale Seite (rechts) 14 Tage nach der Reperfusion. Durch die Kolliquationsnekrose hat sich das Gewebe im Infarktgebiet völlig aufgelöst. Balken = 1,0 mm.

4.2 GFAP-Immunhistochemie

Am 1. Tag nach der Reperfusion zeigen sich in der kontralateralen gesunden Hemisphäre sowohl in der Striatumebene als auch in der Thalamusebene ubiquitär im Hirnparenchym um Blutgefäße konzentrierte, ruhende, nicht aktivierte Astrozyten. Diese betonen insbesondere das Corpus callosum und die Hippocampusregion. Im Infarktkern der ischämischen Hemisphäre färben sich dagegen degenerierende Astrozyten an. Während in den die Infarktbereiche umsäumenden Penumbrazonen der ischämischen Hemisphäre aktivierte, hypertrophierte Astrozyten auf den Plan treten, zeigen sich im an die Penumbrazonen angrenzenden nicht vom Infarkt betroffenen gesunden Gewebe vereinzelt ruhende Astrozyten.

Am 3. postoperativen Tag zeigt sich eine ähnliche Situation wie schon am 1. Tag beschrieben in Bezug auf die kontralaterale gesunde Hemisphäre, die Penumbrazonen und das an die Penumbrazonen angrenzende gesunde Gewebe in der Striatumebene und in der Thalamusebene. Im Infarktkern können größtenteils nur noch Zelltrümmer ausgemacht werden. Ganz vereinzelt werden noch degenerierende Astrozyten gesehen.

Am 7. postischämischen Tag stellen sich die Infarktbereiche aufgrund vom Abbau des Gewebes nur noch rudimentär dar (Abb. 4.2). In den Penumbraarealen kommt es zu einer zu früheren Überlebenszeitpunkten noch nicht vorhandenen starken Anfärbbarkeit GFAP-positiver Astrozyten, die die Infarktareale wie ein Band umsäumen (Abb. 4.2). Es stellt sich eine starke Hyperplasie der GFAP-positiven Astrozyten in der Penumbra ein. Die Astrozyten sind balloniert und hypertrophiert (Abb. 4.3). In der kontralateralen gesunden Hemisphäre und im angrenzenden gesunden Gewebe der ischämischen Hemisphäre zeigen sich weiterhin ubiquitär vereinzelt, ruhende, um Blutgefäße gruppierte Astrozyten.

14 Tage nach der Reperfusion sieht man einen leichten Rückgang der Anfärbbarkeit der GFAP-positiven Astrozyten in den Penumbraarealen. Ansonsten gilt das Verteilungsmuster für die Astrozyten wie oben schon mehrfach beschrieben.

Mit Hilfe der GFAP-positiven Astrozyten wird in der vorliegenden Arbeit die Penumbra zur weiteren Auswertung der anderen immunhistochemischen Färbungen definiert, da insbesondere sie sich als eine Region starker Astrozytose darstellt.

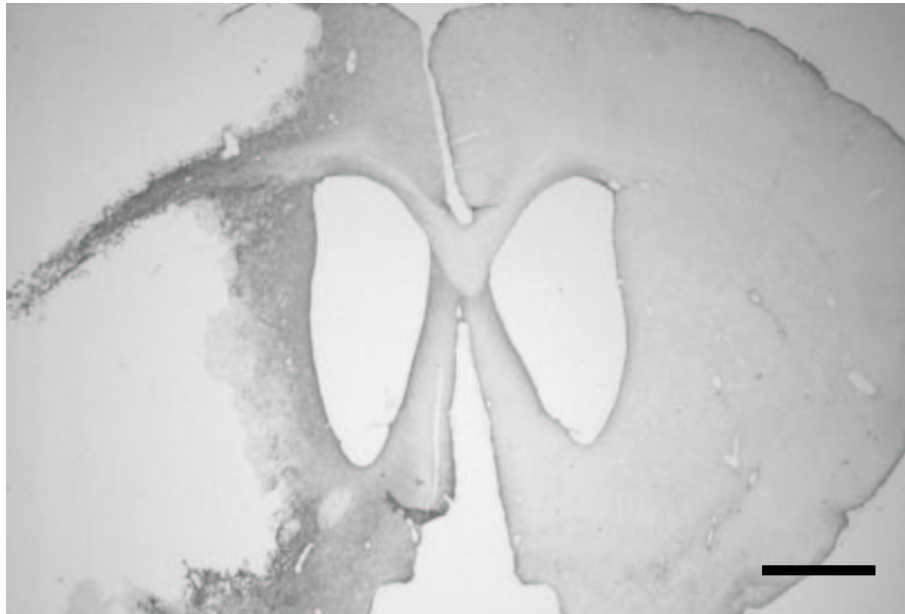


Abbildung 4.2: Frontalschnitt in der Striatumebene, 7 d postop., GFAP-Färbung, 4fache Vergrößerung. Die GFAP-Färbung zeigt die Infarkt- und Penumbraareale im Striatum und im Kortex (links) und die gesunde kontralaterale Seite (rechts) 7 Tage nach der Reperfusion. In den Penumbraarealen kommt es zu einer starken Anfärbbarkeit GFAP-positiver Astrozyten, die die Infarktareale wie ein Band umsäumen. Balken = 1,0 mm.

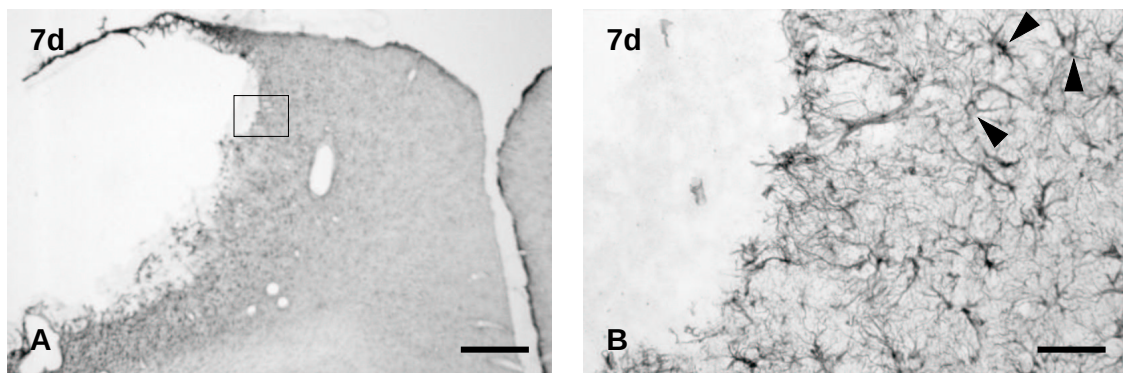


Abbildung 4.3: Frontalschnitte des ischämischen Kortex in der Striatumebene, 7 d postop., GFAP-Färbung, 50 fache (A) und 400 fache (B) Vergrößerung. Die eingerahmte Zone im Kortex korrespondiert zu dem Penumbraareal in der großen Vergrößerung. Am 7. Tag nach der Reperfusion stellt sich eine starke Hyperplasie der GFAP-positiven Astrozyten in der Penumbra (rechts) ein. Die Astrozyten sind balloniert und hypertrophiert (ausgefüllte Pfeile) (B). Balken (A) = 80 μm ; Balken (B) = 10 μm .

4.3 OX 42-Immunhistochemie

Am 1. Tag nach der Reperfusion zeigen sich in der kontralateralen Hemisphäre keine OX 42-positiven Zellen im Striatum und im Kortex in der Ebene des Striatums. In der Ebene des Thalamus färben sich ebenfalls keine Zellen im Hippocampus, Thalamus oder Kortex in der nicht von der Ischämie betroffenen kontralateralen Hemisphäre an. Allerdings können in beiden Ebenen im Corpus callosum ruhende, residente, ramifizierte OX 42-positive Mikrogliazellen ausgemacht werden. Der Infarktkern stellt sich eher OX 42 leer dar. In ihm finden sich Zelltrümmer. In den Penumbraarealen können insbesondere im Striatum und im Corpus callosum OX 42-positive, z.T. aktivierte Mikrogliazellen/Makrophagen ausgemacht werden. Das angrenzende gesunde Gewebe der ischämischen Hirnseite zeigt keine angefärbten Zellen.

Am 3. postischämischen Tag treten kontralateral ubiquitär OX 42-positive, ramifizierte Zellen in der Striatumebene auf. Im kontralateralen Gewebe in der Thalamusebene zeigt sich ebenfalls ubiquitär eine veränderte Anfärbbarkeit für die Mikroglia. OX 42-positive Zellen siedeln sich insbesondere im Corpus callosum und im Hippocampus an. Im Infarktareal zeigen sich neben degenerierenden Mikrogliazellen auch eine große Anzahl OX 42-positiver, schmaler, runder, makrophagenähnlicher Zellen (Abb. 4.4). Aufgrund der Verteilung dieser Zellen läßt sich schließen, daß es sich dabei um über die Bluthirnschranke eingewanderte Makrophagen handelt, die ebenfalls wie Mikrogliazellen durch den immunhistochemischen Marker OX 42 dargestellt werden. Die Penumbraareale sind eher wenig durch OX 42-positive Zellen besiedelt. Das angrenzende gesunde Gewebe der geschädigten Seite zeigt ebenfalls einige angefärbte Zellen.

Am 7. postischämischen Tag setzt eine verstärkte Expression in der kontralateralen gesunden Seite ein. Das Gewebe der Infarktareale ist weitgehend aufgelöst. Es zeigt sich eine starke Aktivität an OX 42-positiven Zellen in der den ischämischen Kern umgebenden Penumbrazone. Die Mikrogliazellen/Makrophagen der Penumbra reagieren auf die Ischämie mit einer Proliferation und einer Umwandlung in ihre typische kugelige, amöboide, phagozytoseaktive Form (Abb. 4.4). Das angrenzende gesunde Gewebe ist weiterhin durch OX 42-positive Zellen geprägt.

Am 14. Tag zeigt die kontralaterale gesunde Hemisphäre nur ganz vereinzelt OX 42-positive Zellen. Die starke Anfärbbarkeit der Zellen in der Penumbra erscheint rückläufig.

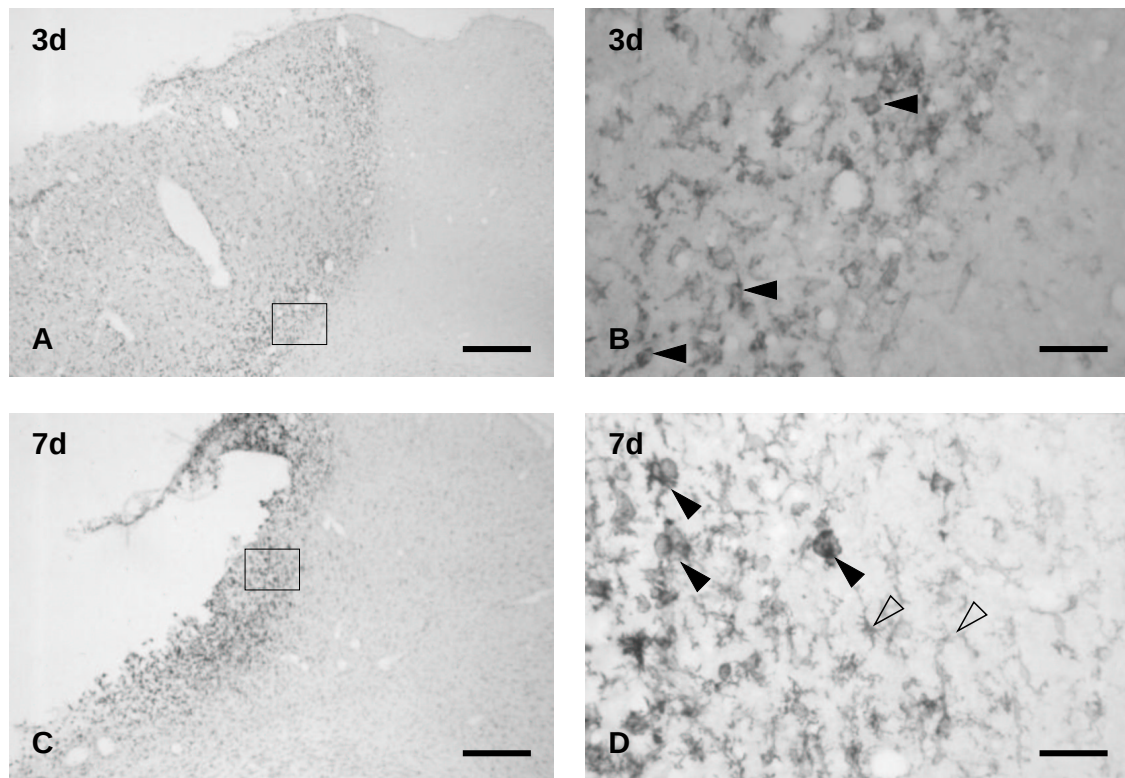


Abbildung 4.4: Frontalschnitte des ischämischen Kortex in der Striatumebene, 3 d (A,B) und 7 d (C,D) postop., OX 42-Färbung, 50 fache (A,C) und 400 fache (B,D) Vergrößerung. Die eingerahmte Zone im Kortex (A) korrespondiert zu dem Infarktareal in der großen Vergrößerung (B). Am 3. Tag nach der Reperfusion zeigen sich neben degenerierenden Mikrogliazellen eine große Anzahl OX 42-positiver schmaler runder, makrophagenähnlicher Zellen (ausgefüllte Pfeile) im Infarktareal (links) (A,B). Die eingerahmte Zone im Kortex (C) korrespondiert zu dem Penumbraareal in der großen Vergrößerung (D). Sieben Tage nach der Reperfusion stellt sich eine starke Reaktivität an OX 42-positiven Zellen in der Penumbrazone (rechts) ein (C,D). Die Mikrogliazellen proliferieren und haben sich umgewandelt von ihrer ruhenden, ramifizierten (unausgefüllte Pfeile) in ihre typische kugelige, amöboide, phagozytoseaktive Form (ausgefüllte Pfeile) um. Balken (A,C) = 80 μm ; Balken (B,D) = 10 μm .

4.4 IL-1 β -Immunhistochemie

Am 1. Tag nach der Reperfusion färben sich sowohl in der Striatumebene als auch in der Thalamusebene bis auf einige vereinzelte kugelige Zellen mit Fortsätzen in der Hippocampusregion noch keine IL-1 β -positiven Zellen im gesunden Gewebe der kontralateralen, nicht von der Ischämie betroffenen Hemisphäre an. In den Infarktarealen zeigen sich meist Zelltrümmer und nur ganz vereinzelt Zellformationen. Dagegen färben sich in den Penumbrazonen IL-1 β -positive Zellen an, die von ihrer Gestalt her an Gliazellen erinnern und z.T. in der Nähe von Gefäßen angesiedelt sind (Abb. 4.5). Das an die Penumbrazonen angrenzende gesunde Gewebe der ischämischen Hemisphäre weist fast keine für den immunhistochemischen Marker IL-1 β positive Zellen auf (Abb. 4.6, Abb. 4.7).

Am 3. postoperativen Tag zeigen sich einige IL-1 β -positive Zellen im Striatum, im Thalamus und im Kortex in der Striatum- und in der Thalamusebene der kontralateralen gesunden Hemisphäre. Die Zellen besitzen große kugelige Zelleiber und z.T. kürzere, z.T. längere Fortsätze. In den Infarktarealen werden weiterhin Zelltrümmer gesehen. Die Penumbraareale sind von vielen IL-1 β -positiven Zellen besiedelt. Diese Zellen haben ebenfalls Fortsätze, die sich eher kurz darstellen. Im an die Penumbrazonen angrenzenden gesunden Gewebe treten Zellen mit langen, durch die Kortexschichten ziehenden Fortsätzen auf.

7 Tage nach dem Ischämieereignis verstärkt sich die Expression IL-1 β -positiver Zellen im Striatum, im Hippocampus, im Thalamus und im Kortex in der Striatum- und in der Thalamusebene der kontralateralen gesunden Hemisphäre. Das Infarktgewebe ist fast vollständig aufgelöst. Die Anzahl IL-1 β -positiver Zellen in den Penumbraarealen nimmt weiter zu. Es sind Zellen mit großen, kugeligen Zelleibern mit z.T. kürzeren, z.T. längeren Fortsätzen (Abb. 4.5). Dabei könnte es sich bei diesen Zellen um amöboide Gliazellen oder eventuell auch um Neurone handeln. Das angrenzende gesunde Gewebe zeigt weiterhin Zellen mit langen, durch die Schichten des Kortex ziehenden Fortsätzen.

Am 14. Tag tauchen in der kontralateralen gesunden Hemisphäre schließlich nur noch einige wenige, schwach angefärbte IL-1 β -positive Zellen auf. Dies gilt ebenso für das an die Penumbrazonen angrenzende gesunde Gewebe der ischämischen Hemisphäre. Dort werden nur noch selten Zellen mit kugeligen Zelleibern angetroffen. Auch das Gebiet der Penumbra ist am 14. postischämischen Tag durch eine Abnahme der IL-1 β -positiven Zellen gekennzeichnet (Abb. 4.5).

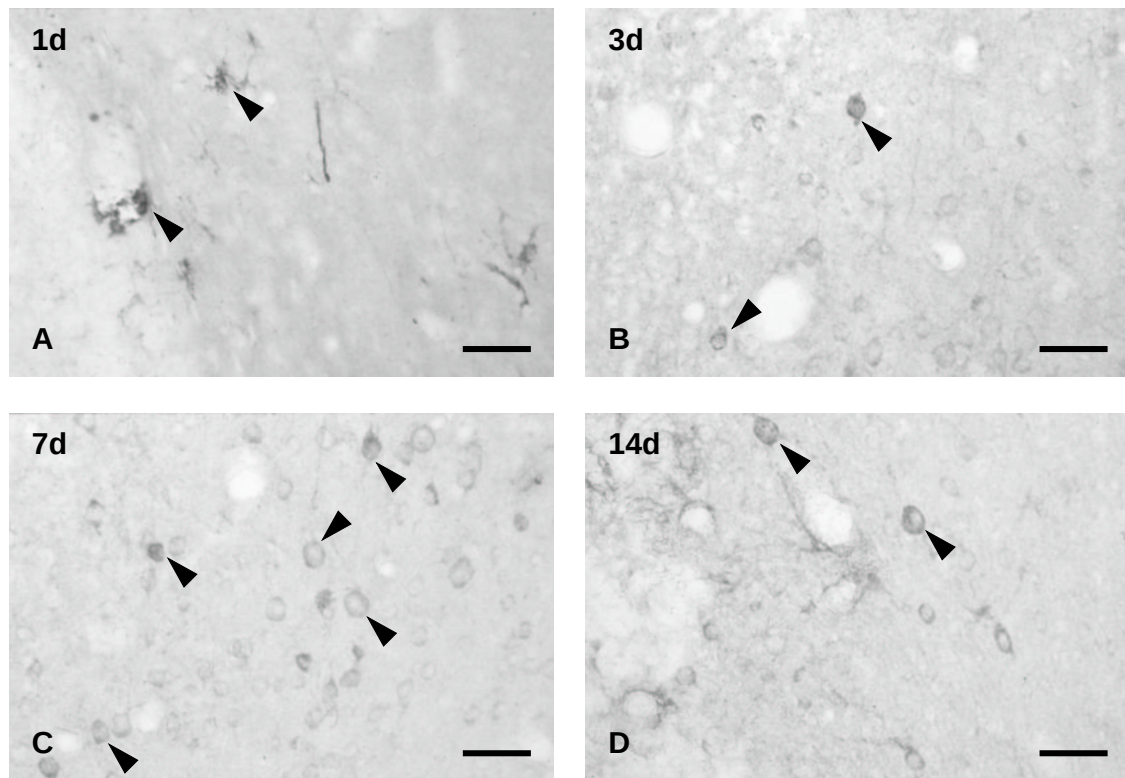


Abbildung 4.5: Frontalschnitte des ischämischen Kortex in der Striatumebene, 1 d (A), 3 d (B), 7 d (C) und 14 d (D) postop., IL-1 β -Färbung, 400fache Vergrößerung. Am 1. Tag nach der Reperfusion färben sich IL-1 β -positive Zellen in der Penumbra (rechts) an, die in ihrer Morphologie an Gliazellen erinnern und z.T. in der Nachbarschaft von Gefäßen angesiedelt sind (ausgefüllte Pfeile) (A). 3, 7 und 14 Tage nach der Reperfusion treten je nach Überlebenszeit eine verschieden große Anzahl an IL-1 β -positiven Zellen in der Penumbra (rechts) auf, die große kugelige Zelleiber und z.T. kürzere, z.T. längere Fortsätze aufweisen (ausgefüllte Pfeile) (B,C,D). Diese Zellen zeigen ein besonders starkes Anfärbeverhalten in der Penumbrazone am 7. Tag nach der Reperfusion (ausgefüllte Pfeile) (C). Balken (A,B,C,D) = 10 μ m.

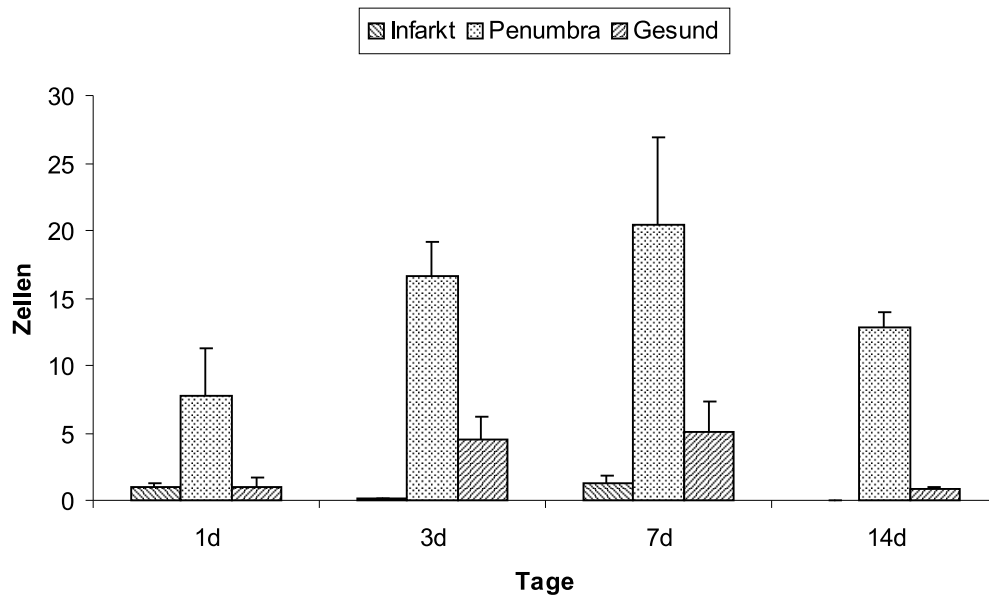


Abbildung 4.6: Anzahl der IL-1 β -positiven Zellen in 40.000 μm^2 des ischämischen Kortex in der Ebene des Striatums im Infarktareal, in der Penumbra und im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe. Zeitverlauf: 1d, 3d, 7d, 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

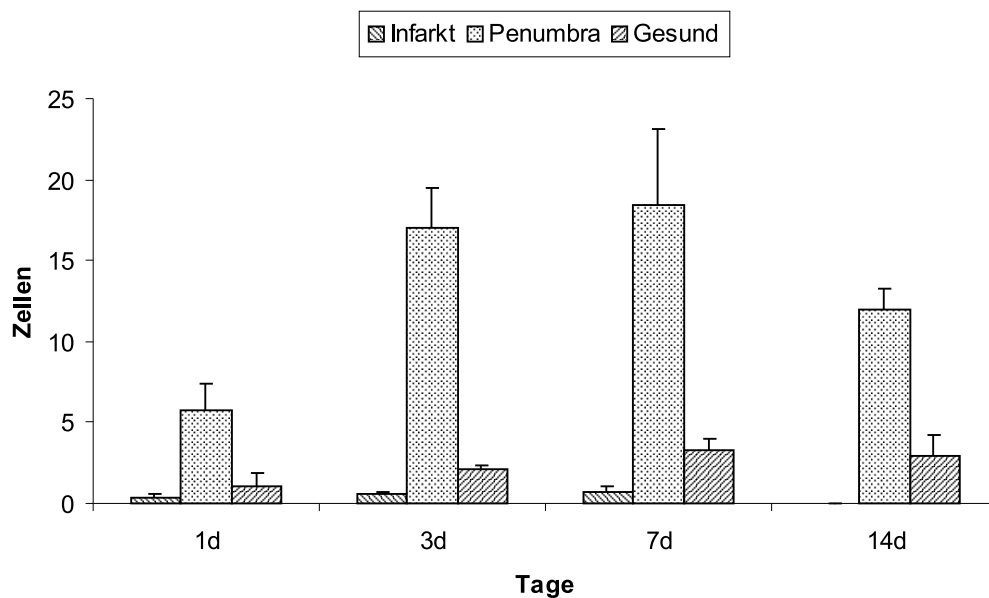


Abbildung 4.7: Anzahl der IL-1 β -positiven Zellen in 40.000 μm^2 des ischämischen Kortex in der Ebene des Thalamus im Infarktareal, in der Penumbra und im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe. Zeitverlauf: 1d, 3d, 7d, 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

4.5 IL-6-Immunhistochemie

1 Tag nach der Ischämie zeigen sich im gesunden Gewebe der kontralateralen, nicht geschädigten Hirnhälfte sowohl in der Ebene des Striatums als auch in der Ebene des Thalamus keine IL-6-positiven Zellen. In den Penumbrazonen dagegen zeigen sich schon mehrere IL-6-positive Zellen (Abb. 4.9, Abb. 4.10). Sie zeigen einen runden Zelleib und besitzen in der Regel keine Fortsätze. Dies könnte auf Gliazellen hindeuten. In den an die Penumbrazonen angrenzenden gesunden Gewebeabschnitten der ischämischen Hemisphäre färben sich keine IL-6-positiven Zellen an. In den Infarktarealen befinden sich Zelltrümmer und nur ganz vereinzelt abgrenzbare Zellen.

Am 3. Tag nach der Reperfusion steigt die Expression IL-6-positiver Zellen im Striatum, im Hippocampus, im Thalamus und im Kortex in der Striatum- und in der Thalamusebene der kontralateralen gesunden Hemisphäre an. Die Zellen zeichnen sich durch große, kugelige Zelleiber und z.T. kürzere, z.T. längere Fortsätze aus. Die Zelltrümmer in den Infarktbereichen sind weiterhin vorhanden. Diese werden durch eine Penumbrazone mit mehreren IL-6-positiven Zellen umsäumt, die eher kurze Fortsätze aufweisen. Im an die Penumbrazonen angrenzenden gesunden Gewebe erscheinen Zellen mit langen, durch den Kortex ziehenden Fortsätzen.

Am 7. postoperativen Tag färben sich die IL-6-positiven Zellen in den Penumbrazonen ganz besonders stark an (Abb. 4.9, Abb. 4.10). Die großen, kugeligen Zelleiber mit z.T. kürzeren, z.T. längeren Fortsätzen sind deutlich zu sehen (Abb. 4.8). Unter diesen Zellen könnten sich, wie sich beim Durchfokussieren der Schnitte zeigt, einige Neurone befinden. Das Gewebe des benachbarten Infarktes weist noch einige IL-6-positive Zellen auf. Das angrenzende gesunde Gewebe zeigt weiterhin Zellen mit langen, durch die Schichten des Kortex ziehenden Fortsätzen. Die Expression IL-6-positiver Zellen im Striatum, im Hippocampus, im Thalamus und im Kortex in der Striatum- und in der Thalamusebene der kontralateralen gesunden Hemisphäre verstärkt sich ebenfalls weiterhin.

Am 14. Tag bleiben in der kontralateralen gesunden Hemisphäre nur noch vereinzelt IL-6-positive Zellen bestehen. Auch die Penumbra der geschädigten Hemisphäre weist eine mehr oder weniger große Reduktion der IL-6-positiven Zellen auf. Im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe erfahren die IL-6-positiven Zellen nur noch selten eine Anfärbung.

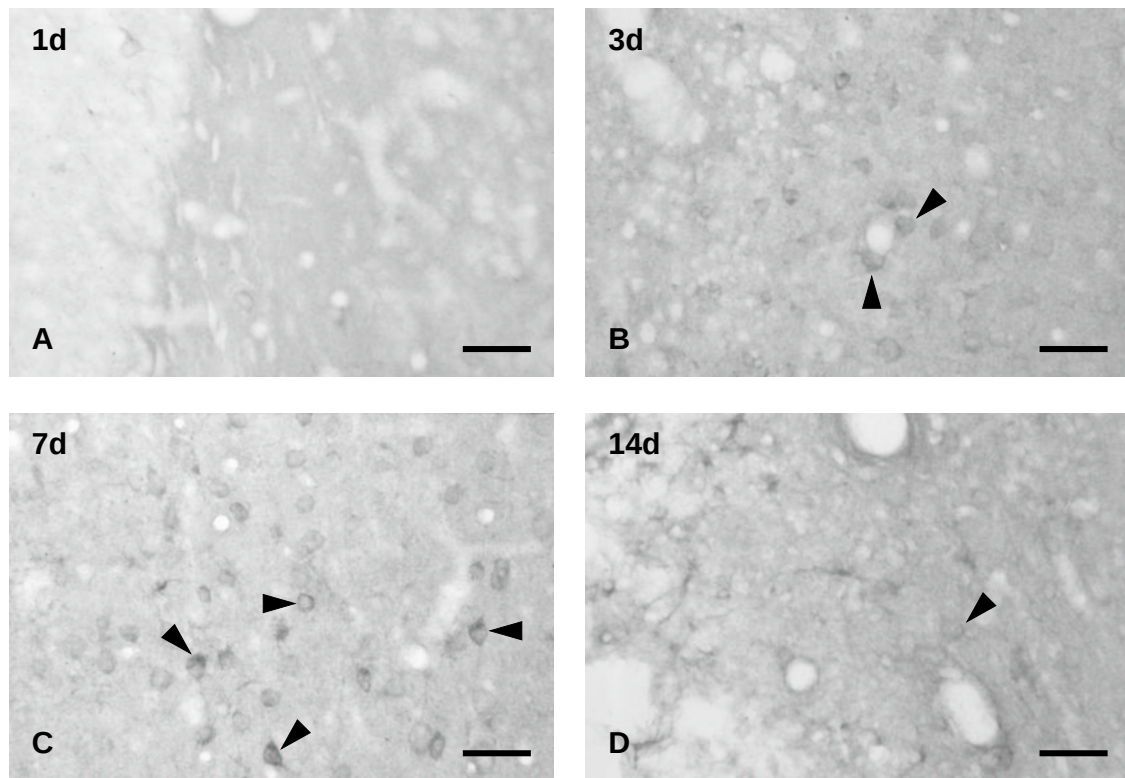


Abbildung 4.8: Frontalschnitte des ischämischen Kortex in der Striatumebene, 1 d (A), 3 d (B), 7 d (C) und 14 d (D) postop., IL-6-Färbung, 400fache Vergrößerung. Dargestellt ist wiederum im jeweiligen Schnitt links der Infarkt und rechts die Penumbra. Am 1. Tag nach der Reperfusion färben sich sehr diskret IL-6-positive Zellen in der Penumbra an (A). Das Anfärbeverhalten steigert sich mit Zunahme der Überlebenszeiten. Es zeigen sich IL-6-positive Zellen (B,C,D), die große, kugelige Zelleiber und z.T. kürzere, z.T. längere Fortsätze haben (ausgefüllte Pfeile). Am 7. postoperativen Tag färben sich diese Zellen besonders stark an (C). Balken (A,B,C,D) = 10 μ m.

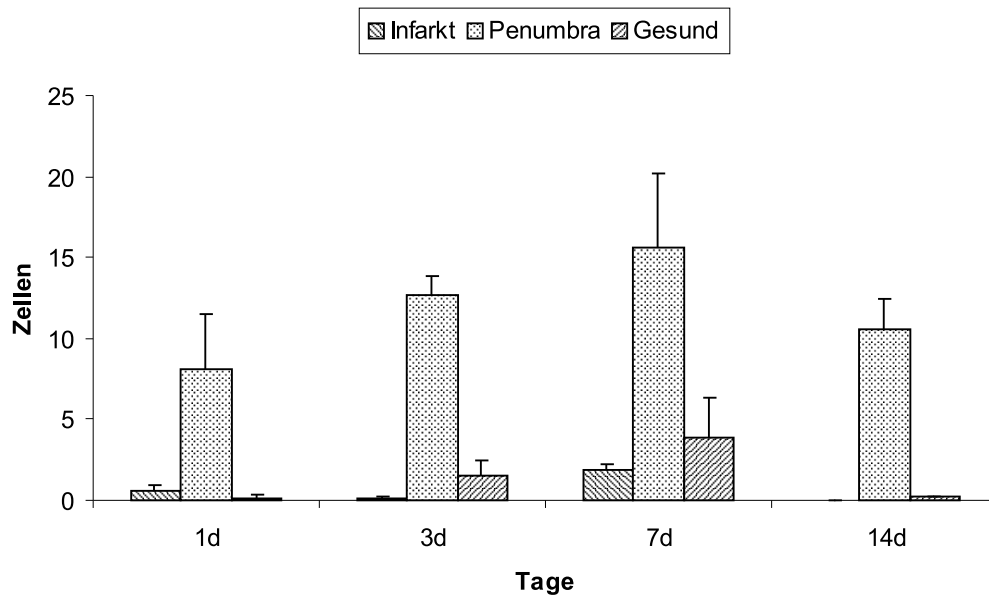


Abbildung 4.9: Anzahl der IL-6-positiven Zellen in $40.000 \mu\text{m}^2$ des ischämischen Kortex in der Ebene des Striatums im Infarktareal, in der Penumbra und im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe. Zeitverlauf: 1d, 3d, 7d, 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

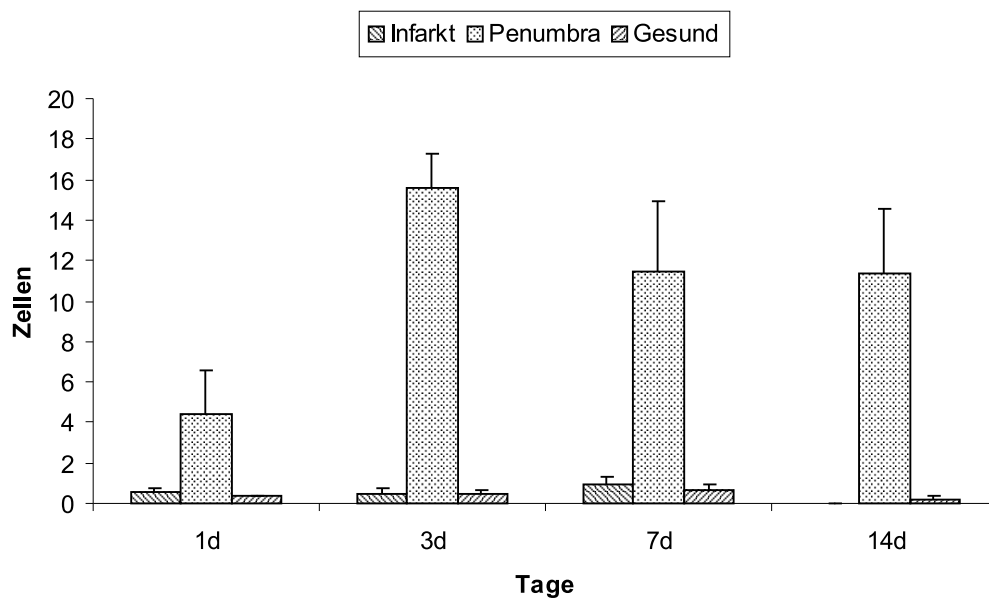


Abbildung 4.10: Anzahl der IL-6-positiven Zellen in $40.000 \mu\text{m}^2$ des ischämischen Kortex in der Ebene des Thalamus im Infarktareal, in der Penumbra und im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe. Zeitverlauf: 1d, 3d, 7d, 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

4.6 TNF- α -Immunhistochemie

Am 1. postischämischen Tag werden weder in der Striatumebene noch in der Thalamusebene TNF- α -positive Zellen im gesunden Gewebe der kontralateralen, nicht von der Ischämie betroffenen Hemisphäre angetroffen. Die Infarktbereiche in der geschädigten Hemisphäre zeigen neben Zelltrümmern auch einige TNF- α -positive Zellen. In den Penumbraebereichen färben sich sehr vereinzelt TNF- α -positive Zellen an (Abb. 4.12, Abb. 4.13). Im gesunden an die Penumbraebereiche angrenzenden Gewebe der ischämischen Hemisphäre können dagegen keine TNF- α -positiven Zellen gesehen werden.

Am 3. postoperativen Tag steigt die Anfärbbarkeit TNF- α -positiver Zellen im Striatum, im Hippocampus, im Thalamus und im Kortex in der Striatum- und in der Thalamusebene der kontralateralen gesunden Hemisphäre an. Die Zellen weisen große, kugelige Zelleiber und z.T. kürzere, z.T. längere Fortsätze auf. Die Gegend des Infarktes läßt weiterhin Zelltrümmer erkennen. In den Penumbraarealen zeigt sich eine steigende Anzahl TNF- α -positiver Zellen, die eher kurze Fortsätze besitzen und somit eher an Glia erinnern. Im an die Penumbrazone angrenzenden gesunden Gewebe weisen die Zellen lange, durch die Kortesschichten ziehende Fortsätze auf.

Am 7. postoperativen Tag erscheint eine besonders starke Anfärbbarkeit oben beschriebener Zellen. Die deutlich gesteigerte Expression TNF- α -positiver Zellen zeigt sich im Striatum, im Hippocampus, im Thalamus und im Kortex der Striatum- und der Thalamusebene der kontralateralen gesunden Hemisphäre. Aber auch das Anfärbeverhalten TNF- α -positiver Zellen in den Penumbraarealen nimmt weiter zu (Abb. 4.11, Abb. 4.12, Abb. 4.13). Bei den großen, kugeligen Zelleibern mit z.T. kürzeren, z.T. längeren Fortsätzen scheint es sich erneut um Gliazellen zu handeln. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich auch einige Neurone angefärbt haben. Das an die Penumbra angrenzende gesunde Gewebe beherbergt weiterhin Zellen mit langen durch die Schichten des Kortex ziehenden Fortsätze. Das Infarktgewebe stellt sich aufgrund des Zellverlustes fast nicht mehr dar.

14 Tage nach dem Ischämieereignis färben sich in der kontralateralen gesunden Hemisphäre fast keine TNF- α -positiven Zellen mehr an. Dies gilt ebenso für das an die Penumbrazone angrenzende gesunde Gewebe der geschädigten Hemisphäre, in dem noch vereinzelt Zellen mit kugeligen Zelleibern angetroffen werden. Auch das Gebiet der Penumbra ist am 14. postischämischen Tag durch eine Abschwächung der Anfärbbarkeit TNF- α -positiver Zellen gekennzeichnet (Abb. 4.11).

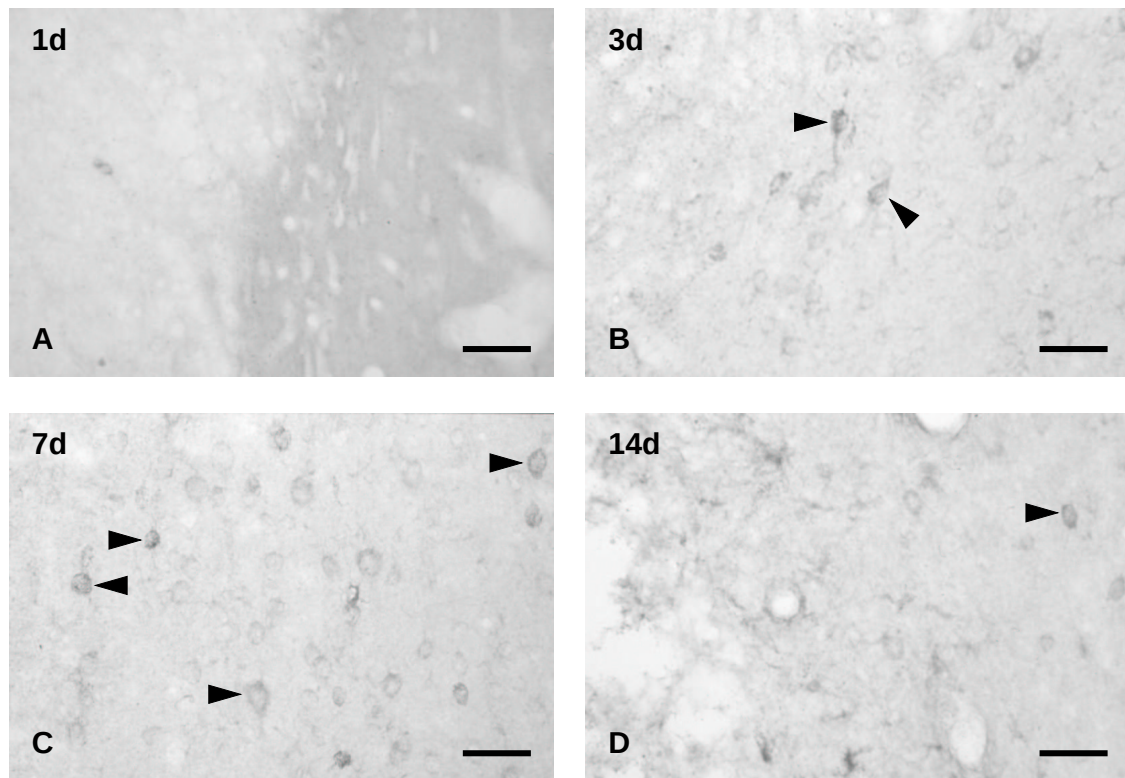


Abbildung 4.11: Frontalschnitte des ischämischen Kortex in der Striatumebene, 1 d (A), 3 d (B), 7 d (C) und 14 d (D) postop., TNF- α -Färbung, 400 fache Vergrößerung. Links stellt sich wiederum der Infarkt und rechts die Penumbra im jeweiligen Schnitt dar. Am 1. Tag nach der Reperfusion färben sich fast keine TNF- α -positive Zellen in der Penumbra an (A). Dies ändert sich am 3., 7. und 14. postischämischen Tag. Es erscheinen TNF- α -positive Zellen (B,C,D), die große, kugelige Zelleiber und z.T. kürzere, z.T. längere Fortsätze besitzen (ausgefüllte Pfeile). Am 7. postoperativen Tag erscheint eine besonders starke Anfärbbarkeit dieser Zellen. Balken (A,B,C,D) = 10 μ m.

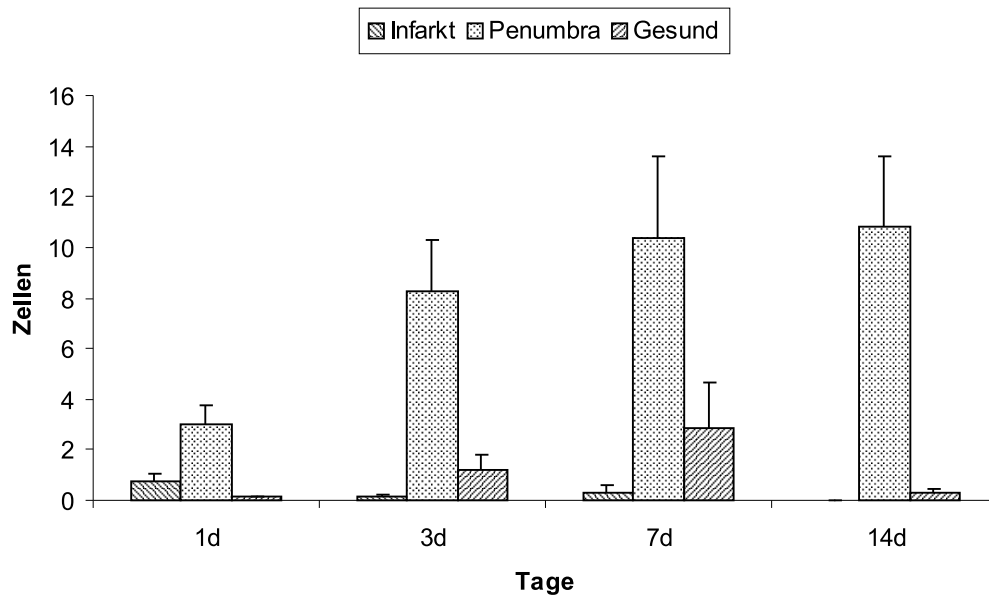


Abbildung 4.12: Anzahl der TNF- α -positiven Zellen in $40.000 \mu\text{m}^2$ des ischämischen Kortex in der Ebene des Striatums im Infarktareal, in der Penumbra und im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe. Zeitverlauf: 1d, 3d, 7d, 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

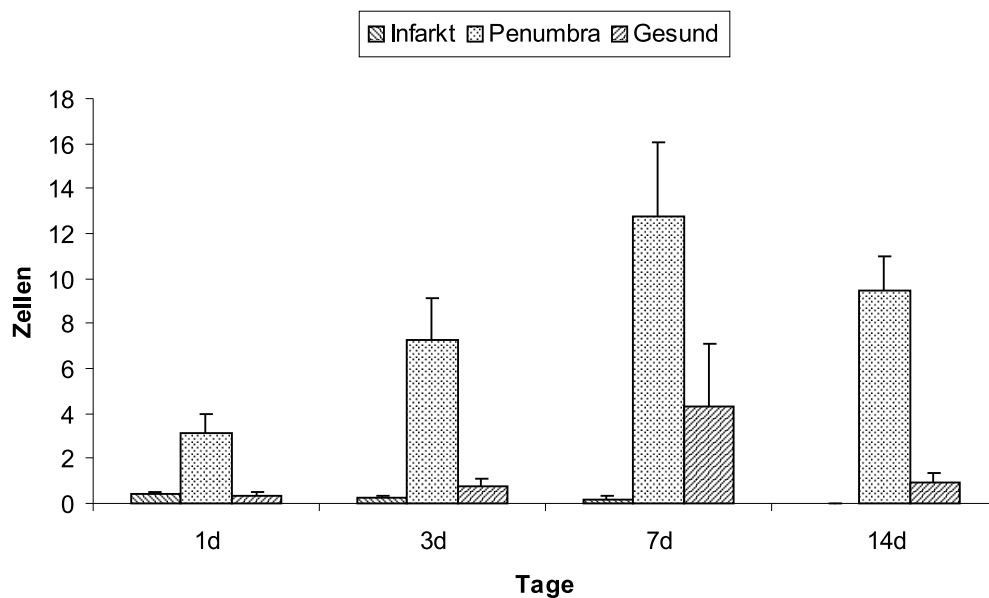


Abbildung 4.13: Anzahl der TNF- α -positiven Zellen in $40.000 \mu\text{m}^2$ des ischämischen Kortex in der Ebene des Thalamus im Infarktareal, in der Penumbra und im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe. Zeitverlauf: 1d, 3d, 7d, 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

4.7 i-NOS-Immunhistochemie

Am 1. Tag nach der Reperfusion zeigt sich eine zarte Expression i-NOS-positiver Zellen in der kontralateralen gesunden Hemisphäre sowohl in der Striatumebene als auch in der Thalamusebene im Parenchym des Striatums, des Hippocampus, des Thalamus und des Kortex. In dem Infarktkern der geschädigten Hemisphäre treten vereinzelt kleine, rundliche, kräftig angefärbte Zellen auf. Diese Art von Zellen färben sich auch in den Penumbrazonen an (Abb. 4.14). Im an die Penumbrazonen angrenzenden, nicht vom Infarkt betroffenen gesunden Gewebe der ischämischen Hemisphäre werden keine i-NOS-positiven Zellen angetroffen.

Am 3. postischämischen Tag beginnt eine stärkere Anfärbung i-NOS-positiver Zellen in der kontralateralen gesunden Hemisphäre. Es zeigt sich eine besondere Betonung der Kortexabschnitte, des Hippocampus und des Thalamus, weniger des Striatums. Die Penumbrazonen und das an die Penumbrazonen angrenzende gesunde Gewebe zeigen eine ansteigende Zahl i-NOS-positiver Zellen in der Striatumebene und in der Thalamusebene (Abb. 4.15, Abb. 4.16). Die Zellen besitzen große, kugelige Zelleiber und z.T. kürzere, z.T. längere Fortsätze. Im Ischämiekern befinden sich keine Zellen mehr.

Am 7. postischämischen Tag stellen sich die Infarktbereiche aufgrund vom Verlust des Gewebes fast nicht mehr dar. In den Penumbraarealen, im angrenzenden gesunden Gewebe der ischämischen Hemisphäre und in der kontralateralen gesunden Hemisphäre kommt es zu einer, zu früheren Überlebenszeitpunkten noch nicht vorhandenen, starken Anfärbbarkeit i-NOS-positiver Zellen (Abb. 4.15, Abb. 4.16), die weiterhin oben beschriebene Morphologie besitzen und größtenteils an Gliazellen erinnern. Allerdings könnten sich auch hier einige Neurone als i-NOS-positive Zellen darstellen.

14 Tage nach der Reperfusion läßt die Anfärbbarkeit der i-NOS-positiven Zellen durchweg in allen oben beschriebenen Gewebsezonen nach. Auch in der Penumbra werden im Vergleich zum 7. Tag weniger i-NOS-positive Zellen gesehen (Abb. 4.14). Dennoch zeigt sich auch am 14. postischämischen Tag noch ein relativ hohes Level der Expression des immunhistochemischen Markers i-NOS.

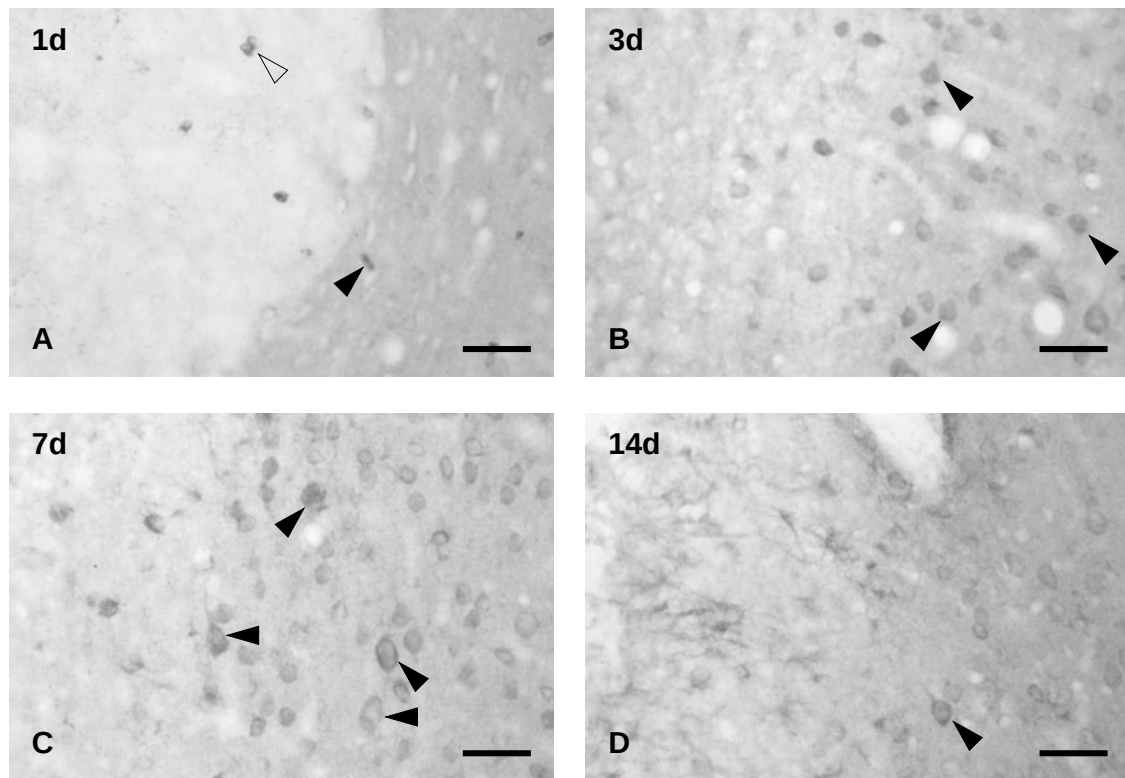


Abbildung 4.14: Frontalschnitte des ischämischen Kortex in der Striatumebene, 1 d (A), 3 d (B), 7 d (C) und 14 d (D) postop., i-NOS-Färbung, 400 fache Vergrößerung. Der Infarkt liegt auf der linken, die Penumbra auf der rechten Seite im jeweiligen Schnitt. Schon am 1. postischämischen Tag zeigen sich vereinzelt i-NOS-positive Zellen sowohl im Infarkt- (unausgefüllter Pfeil) als auch im Penumbra-Bereich (ausgefüllte Pfeile) (A). Am 3., 7. und 14. Tag nach der Ischämie steigert sich die Anzahl i-NOS-positiver Zellen insbesondere in der Penumbrazone (ausgefüllte Pfeile) (B,C,D). Das Anfärbeverhalten dieser Zellen, die große, kugelige Zelleiber und z.T. kürzere, z.T. längere Fortsätze aufweisen (ausgefüllte Pfeile), erfährt am 7. Tag nach der Reperfusion in der Penumbra ein Maximum (C). Balken (A,B,C,D) = 10 μ m.

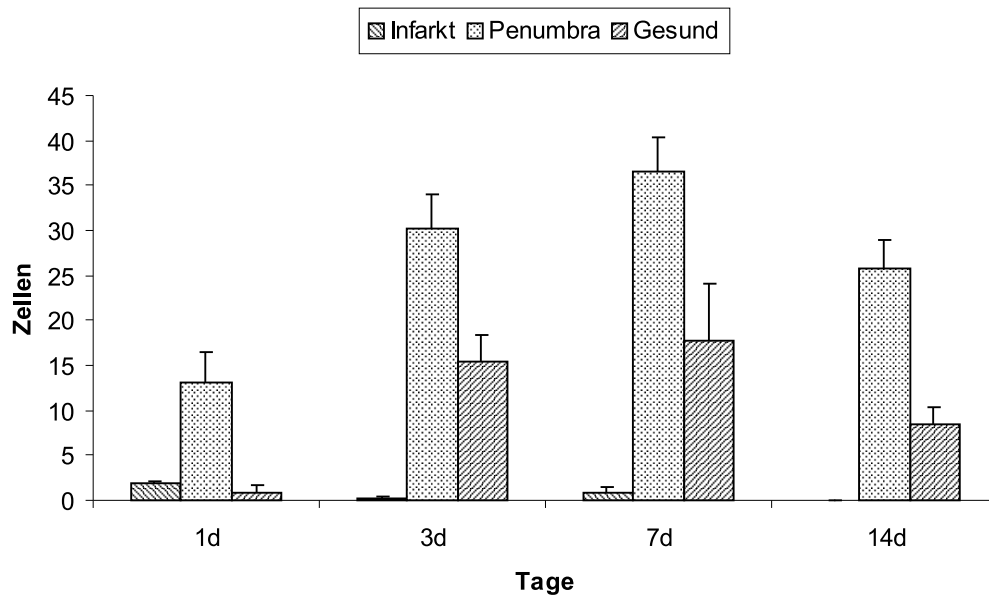


Abbildung 4.15: Anzahl der i-NOS-positiven Zellen in $40.000 \mu\text{m}^2$ des ischämischen Kortex in der Ebene des Striatums im Infarktareal, in der Penumbra und im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe. Zeitverlauf: 1d, 3d, 7d, 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

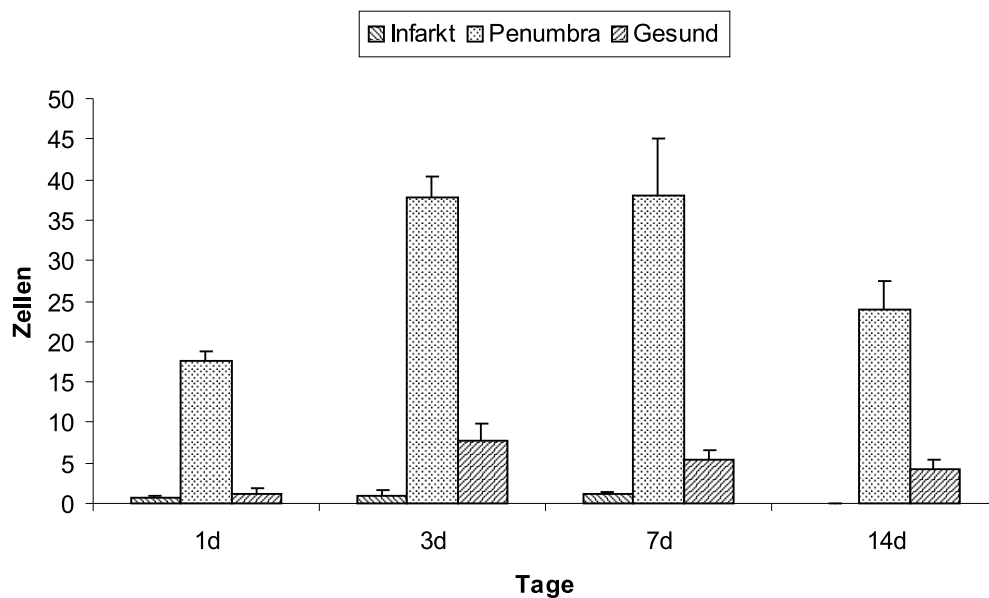


Abbildung 4.16: Anzahl der i-NOS-positiven Zellen in $40.000 \mu\text{m}^2$ des ischämischen Kortex in der Ebene des Thalamus im Infarktareal, in der Penumbra und im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe. Zeitverlauf: 1d, 3d, 7d, 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

4.8 n-NOS-Immunhistochemie

Am 1. Tag nach der Reperfusion zeigen sich in der kontralateralen Hemisphäre viele n-NOS-positive Zellen im Striatum und im Kortex in der Ebene des Striatums. In der Ebene des Thalamus färben sich ebenfalls Zellen im Hippocampus und im Kortex an. Diese gesunden Neurone haben ein großes Perikaryon und lange Fortsätze. Im Infarktkern, in dem sich Zelltrümmer befinden, stellen sich n-NOS-positive degenerierende Neurone, d.h. Neurone, die eine perlschnurartige Verkürzung oder einen völligen Verlust ihrer Fortsätze aufweisen (Abb. 4.18), dar. In den Penumbraarealen und im angrenzenden gesunden Gewebe der ischämischen Hirnseite werden neben degenerierenden auch intakte Neurone, d.h. Neurone mit langen Fortsätzen und großen Perikarien, gesehen (Abb. 4.19, Abb. 4.20).

Am 3. postischämischen Tag treten kontralateral ubiquitär intakte n-NOS-positive Neurone mit langen Fortsätzen in der Striatumebene (Abb. 4.17) und in der Thalamusebene auf. Im Infarktareal zeigen sich weiterhin degenerierende n-NOS-positive Neurone. Die Penumbraareale sind weiterhin durch degenerierende Neurone gekennzeichnet. Zudem werden in den Penumbraarealen auch intakte Neurone gesehen. Im angrenzenden gesunden Gewebe der geschädigten Hemisphäre ist die Anzahl degenerierender Nervenzellen rückläufig.

Am 7. postischämischen Tag setzt sich die oben beschriebene Tendenz fort. Die Expression in der kontralateralen gesunden Seite läßt auch zu diesem Zeitpunkt gesunde Neurone erkennen. Das Gewebe des Infarktgebietes ist weitgehend aufgelöst. Es zeigen sich z.T. noch vereinzelt degenerierende n-NOS-positive Neurone. Die Anzahl der degenerierenden n-NOS-positiven Zellen in der den Ischämiekern umgebenden Penumbrazone sinkt weiter. Im angrenzenden gesunden Gewebe sind intakte, aber fast keine degenerierende Neurone mehr anzutreffen.

Am 14. postischämischen Tag treten fast keine degenerierende Neurone mehr in der Penumbra auf. Die kontralaterale gesunde Hemisphäre, die Penumbra und das angrenzende gesunde Gewebe wird von intakten Neuronen besiedelt (Abb. 4.19, Abb. 4.20). Der Infarktkern stellt sich aufgrund des Verlustes der Zellen nicht mehr dar.

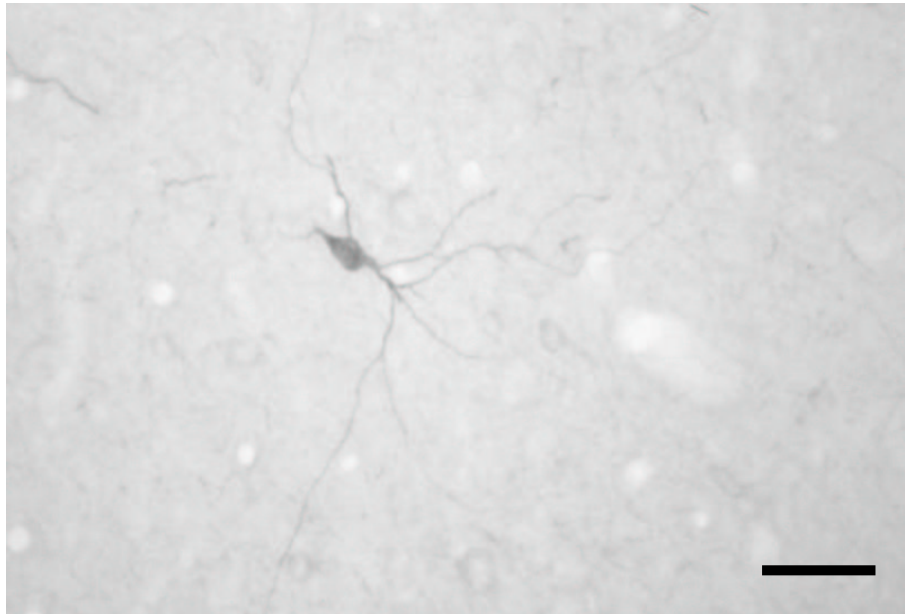


Abbildung 4.17: Frontalschnitt des gesunden kontralateralen Kortex in der Striatumebene, 3 d postop., n-NOS-Färbung, 400fache Vergrößerung. Dargestellt ist ein gesundes Neuron mit langen Fortsätzen. Balken = 10 μm .

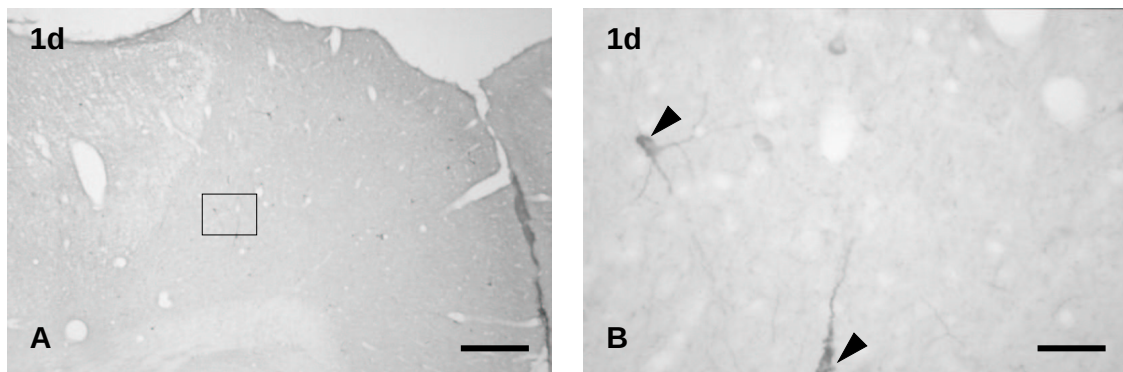


Abbildung 4.18: Frontalschnitte des ischämischen Kortex in der Striatumebene, 1 d postop., n-NOS-Färbung, 50fache (A) und 400fache (B) Vergrößerung. Die eingerahmte Zone im Kortex korrespondiert zu dem Penumbraareal in der großen Vergrößerung. Es zeigen sich am 1. Tag nach der Reperfusion degenerierende Neurone, die eine perlschnurartige Verkürzung oder einen völligen Verlust ihrer Fortsätze aufweisen (ausgefüllte Pfeile) (B). Balken (A) = 80 μm ; Balken (B) = 10 μm .

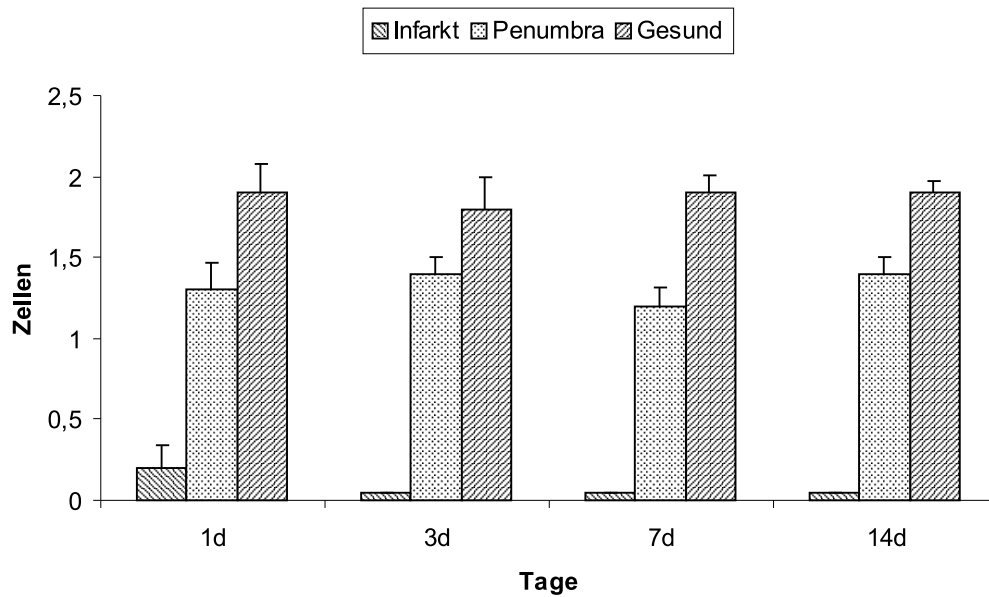


Abbildung 4.19: Anzahl der intakten n-NOS-positiven Zellen in 40.000 μm^2 des ischämischen Kortex in den Ebenen des Striatums und des Thalamus im Infarktareal, in der Penumbra und im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe. Zeitverlauf: 1d, 3d, 7d, 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

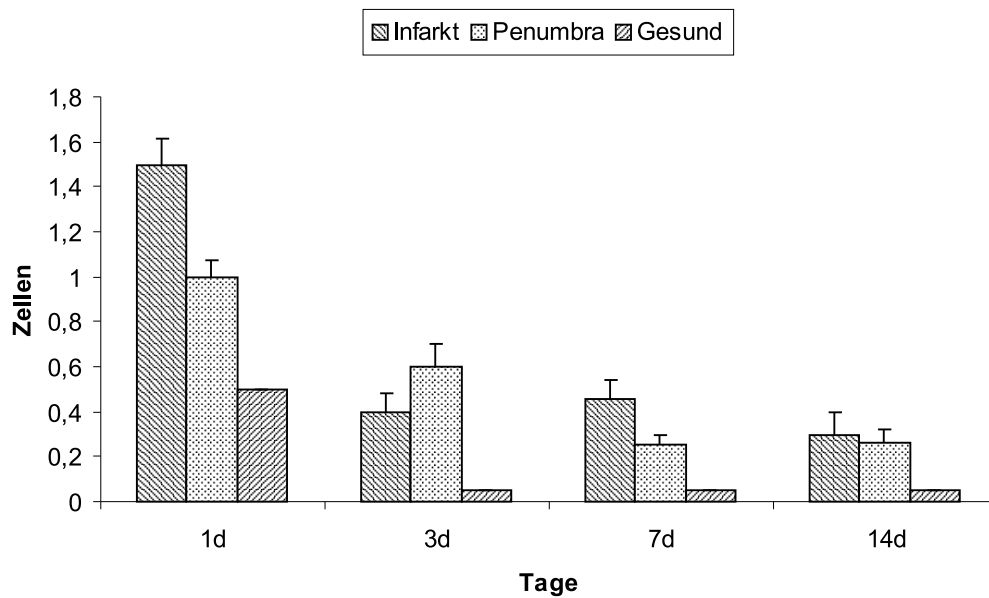


Abbildung 4.20: Anzahl der degenerierenden n-NOS-positiven Zellen in 40.000 μm^2 des ischämischen Kortex in den Ebenen des Striatums und des Thalamus im Infarktareal, in der Penumbra und im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe. Zeitverlauf: 1d, 3d, 7d, 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

4.9 TUNEL-Färbungen

Am 1. postischämischen Tag nach der Reperfusion zeigen sich in der kontralateralen gesunden Hemisphäre weder in der Striatumebene noch in der Thalamusebene TUNEL-positive Zellen im Hirnparenchym. Auch in den die Infarktbereiche umgebenden Penumbrazonen und in den an die Penumbrazonen angrenzenden, nicht vom Infarkt betroffenen gesunden Gewebe der ischämischen Hemisphäre sind keine TUNEL-positive Zellen ausfindig zu machen. Dagegen zeigen sich im Infarktkern der von der Ischämie betroffenen Hemisphäre mehrere TUNEL-positive Zellen.

Am 3. postoperativen Tag stellt sich die Situation ähnlich wie schon am 1. Tag beschrieben in Bezug auf die kontralaterale gesunde Hemisphäre und das an die Penumbrazonen angrenzende gesunde Gewebe in der Striatumebene und in der Thalamusebene dar. In den Penumbrazonen werden vereinzelt TUNEL-positive Zellen gesehen. In den Infarktkernen dagegen färbt sich ein Maximum an TUNEL-positiven Zellen an (Abb. 4.21, Abb. 4.23, Abb. 4.24).

Am 7. postischämischen Tag läßt das Anfärbeverhalten der Zellen im Bereich des Infarktes nach. In den Penumbraarealen kommt es dagegen weiterhin zu einer Expression TUNEL-positiver Zellen. In der kontralateralen gesunden Hemisphäre und im angrenzenden gesunden Gewebe der ischämischen Hemisphäre zeigen sich dagegen weiterhin keine TUNEL-positiven Zellen.

14 Tage nach der Reperfusion wird der Infarktbereich aufgrund des Zellunterganges nicht mehr gesehen. In den Penumbraarealen zeigen sich nun vermehrt TUNEL-positive Zellen (Abb. 4.22, Abb. 4.23, Abb. 4.24). In der kontralateralen gesunden Hemisphäre und im angrenzenden gesunden Gewebe der ischämischen Hemisphäre können keine TUNEL-positiven Zellen nachgewiesen werden.

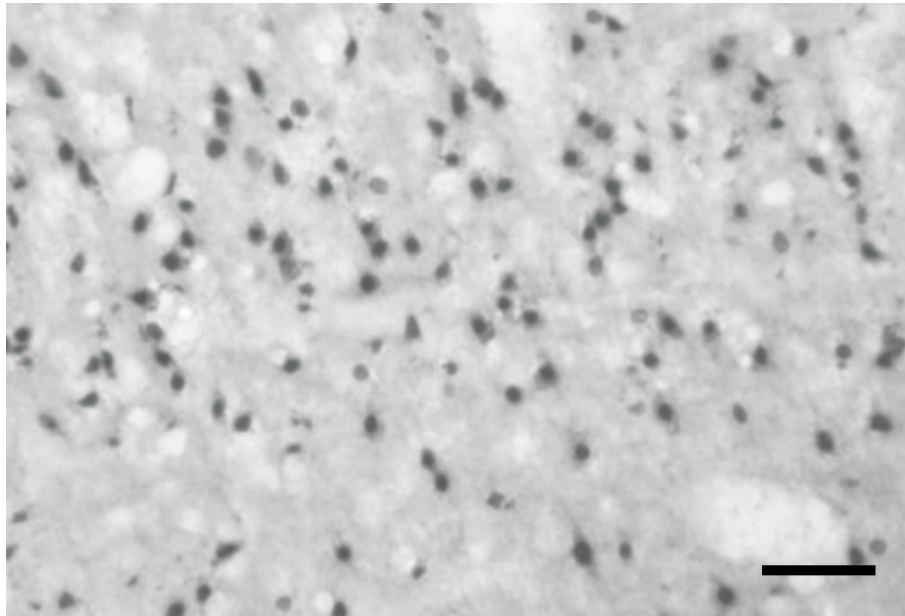


Abbildung 4.21: Frontalschnitt des ischämischen Kortex in der Striatumebene, 3 d postop., TUNEL-Färbung, 400fache Vergrößerung. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem Infarktgebiet, in dem sich eine große Anzahl TUNEL-positiver Zellen anfärbt. Balken = 10 μm .

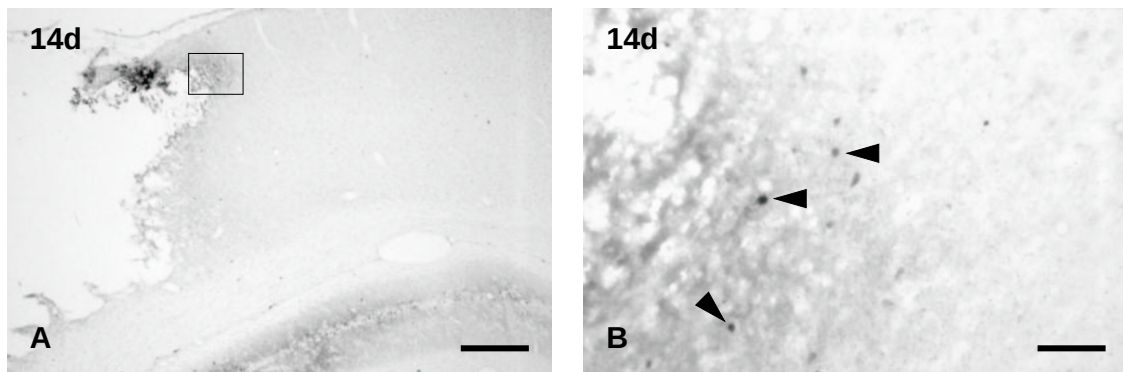


Abbildung 4.22: Frontalschnitte des ischämischen Kortex in der Thalamusebene, 14 d postop., TUNEL-Färbung, 50fache (A) und 400fache (B) Vergrößerung. Die eingerahmte Zone im Kortex korrespondiert zu dem Penumbraareal in der großen Vergrößerung. Am 14. postischämischen Tag zeigen sich vermehrt TUNEL-positive Zellen im Penumbragebiet (rechts) (ausgefüllte Pfeile) (B). Balken (A) = 80 μm ; Balken (B) = 10 μm .

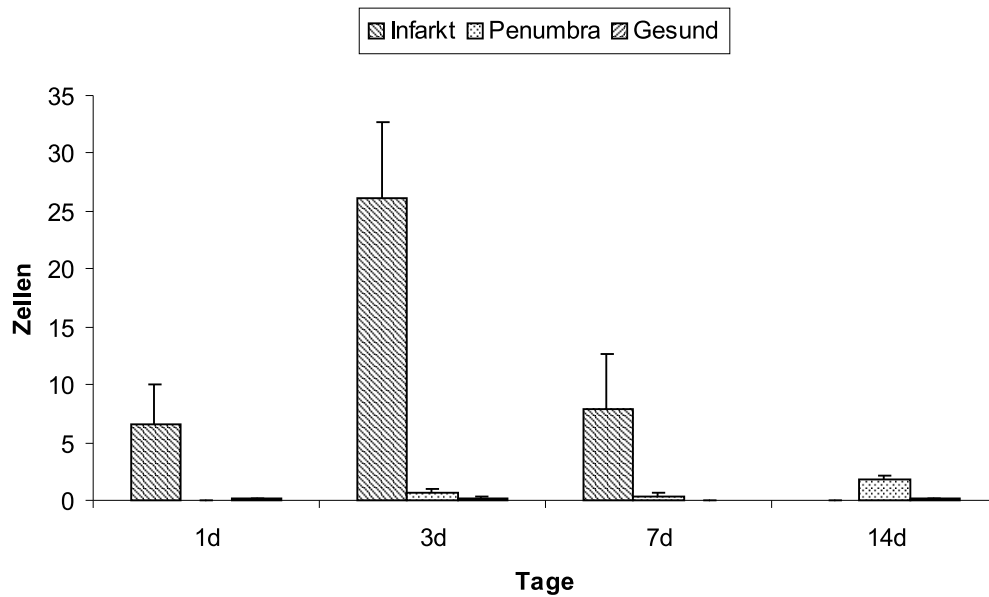


Abbildung 4.23: Anzahl der TUNEL-positiven Zellen in $40.000 \mu\text{m}^2$ des ischämischen Kortex in der Ebene des Striatums im Infarktareal, in der Penumbra und im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe. Zeitverlauf: 1d, 3d, 7d, 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

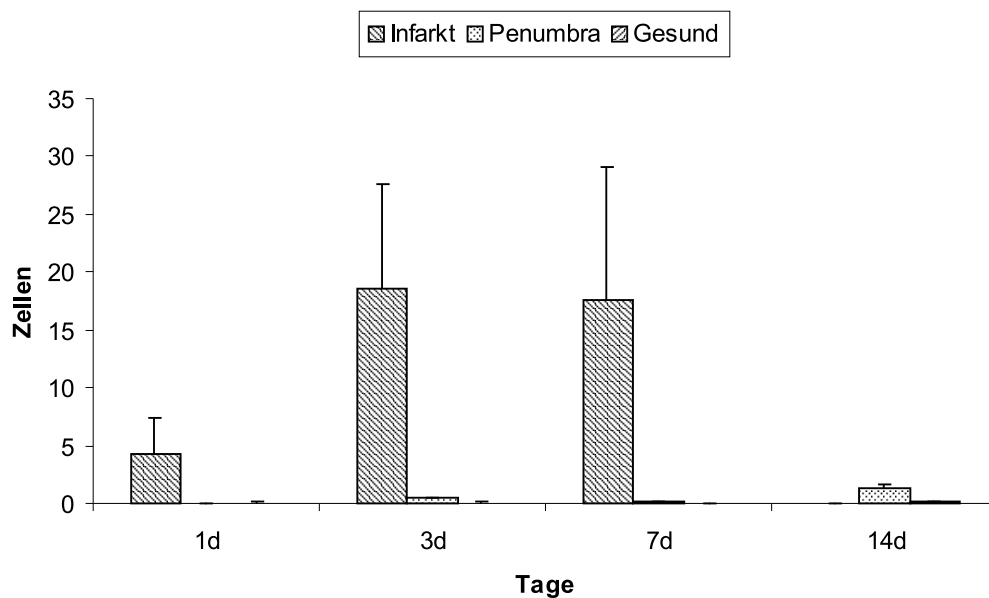


Abbildung 4.24: Anzahl der TUNEL-positiven Zellen in $40.000 \mu\text{m}^2$ des ischämischen Kortex in der Ebene des Thalamus im Infarktareal, in der Penumbra und im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe. Zeitverlauf: 1d, 3d, 7d, 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

4.10 NISSL-Färbungen

4.10.1 NISSL-Färbung im ischämischen Kortex

Die Auszählung der NISSL-positiven Zellen im ischämischen Kortex erfolgte nur am 14. postischämischen Tag (Abb. 4.25 und Abb. 4.26). Der Infarktkern stellt sich am 14. postischämischen Tag aufgrund des Gewebsverlustes nicht mehr dar. Das Gewebe ist aufgrund der Kolliquationsnekrose verloren gegangen. In der Penumbrazone scheint eine Reduktion an Neuronen vorzuliegen. Eine statistische Analyse (Student's T-Test) der Zelldichten sowohl in der Ebene des Striatums als auch in der des Thalamus ergab jedoch weder zwischen Penumbra und „Spiegelbildpenumbra“ noch zu der an die Penumbra angrenzenden Kortexregion mit unbeschädigtem Gewebe einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).

4.10.2 NISSL-Färbung in der „Spiegelbildpenumbra“

Die Auszählung der NISSL-positiven Zellen in der „Spiegelbildpenumbra“ des kontralateralen gesunden Kortex erfolgte nur am 14. postischämischen Tag (Abb. 4.25 und Abb. 4.26). In der „Spiegelbildpenumbra“ werden intakte Neurone mit großen Perikarien und deutlichen Nukleoli gesehen. Die Anzahl der intakten Neurone in der „Spiegelbildpenumbra“ entspricht etwa der Anzahl der intakten Neurone des an die Zone der Penumbra angrenzenden gesunden Gewebes der ischämischen Hemisphäre (Abb. 4.25 und Abb. 4.26).

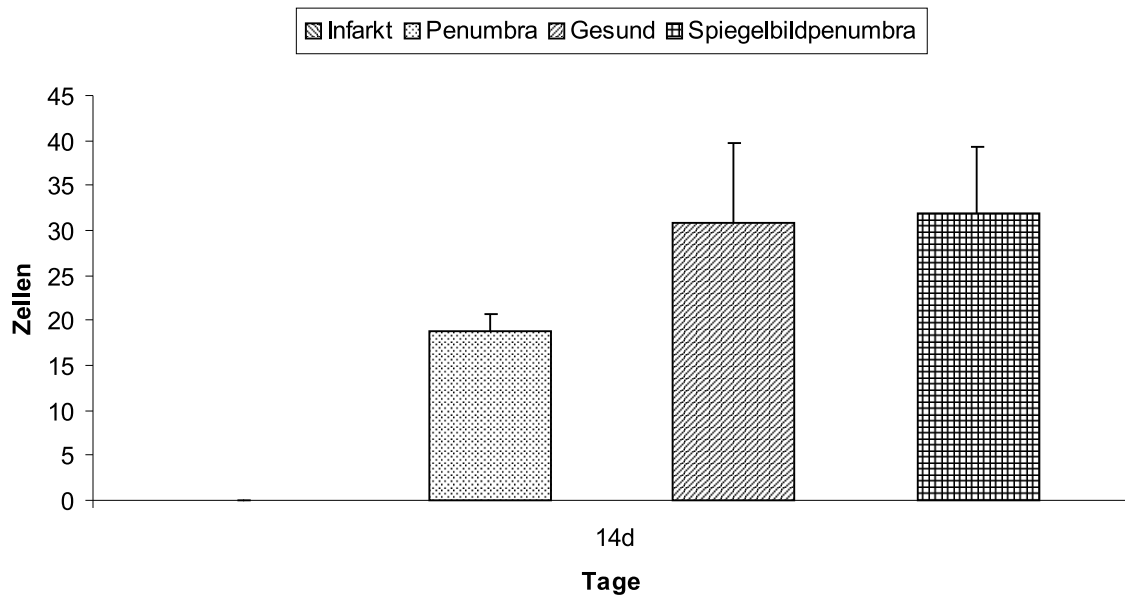


Abbildung 4.25: Anzahl der NISSL-positiven Zellen in $40.000 \mu\text{m}^2$ des ischämischen Kortex in der Ebene des Striatums im Infarktareal, in der Penumbra, im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe und in der Spiegelbildpenumbra des kontralateralen gesunden Kortex. Zeitpunkt: 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

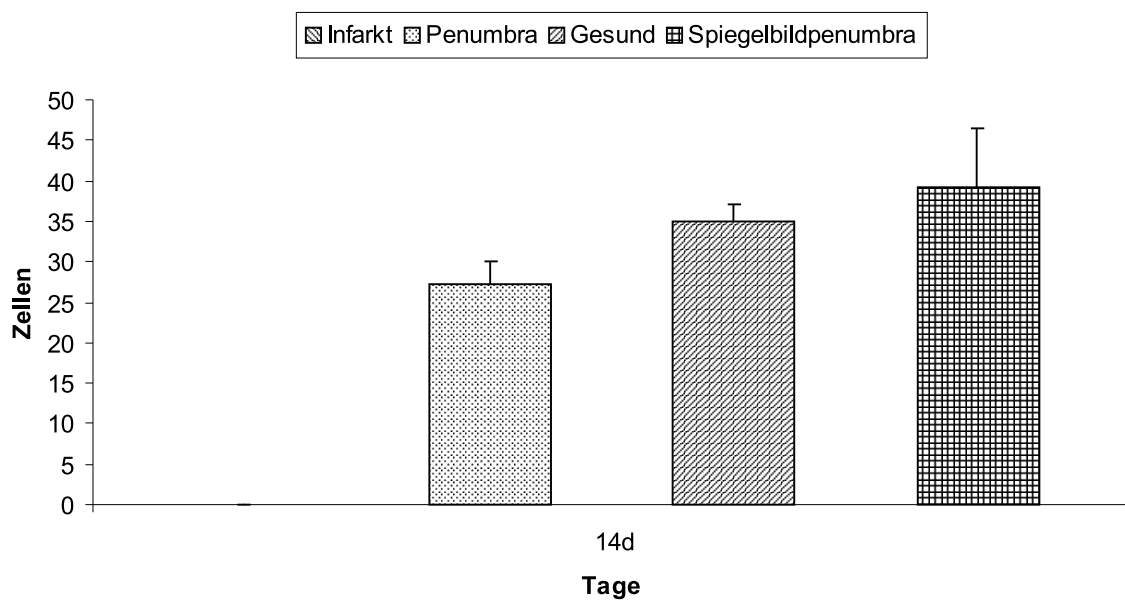


Abbildung 4.26: Anzahl der NISSL-positiven Zellen in $40.000 \mu\text{m}^2$ des ischämischen Kortex in der Ebene des Thalamus im Infarktareal, in der Penumbra, im an die Penumbra angrenzenden gesunden Gewebe und in der Spiegelbildpenumbra des kontralateralen gesunden Kortex. Zeitpunkt: 14d. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Bestätigung des „Fadenmodells“ der MCAO als Läsionsmodell

Das in dieser Arbeit verwandte Läsionsmodell, das sog. „Fadenmodell“, ermöglichte durch Reperfusion die Rekanalisation eines verschlossenen Gefäßes zu imitieren. Dies geschah in unseren Experimenten in Anlehnung an Memezawa et al. [84]. Diese Arbeitsgruppe entwickelte das Modell von Koizumi et al. [68] durch das Benutzen eines Führungskatheters für den einzuführenden Faden weiter. Die neue Prozedur sollte das Auftreten von Blutungen vermindern bzw. verhindern. Dies konnte durch unsere Versuche bestätigt werden. Memezawa et al. [84] waren daran interessiert aufzuzeigen, daß Überlappungen zwischen neokortikalen Arealen, die vom Infarkt betroffen sind, und neokortikalen Arealen, die durch Reperfusion rettbar sind, existieren. So spricht auch diese Arbeitsgruppe, genauso wie hier gezeigt, davon, daß große Anteile des Kortex als „perifokal“ oder besser als „penumbral“ zu bezeichnen sind [84]. Auch in weiteren früheren Arbeiten ist nach einer transienten fokalen Ischämie durch den Verschluß der A. cerebri media eine Periinfarktregion beschrieben worden, in der sich ein selektiver neuronaler Schaden zeigt [85, 71].

Wir sahen nach der von uns gewählten Ischämiezeit von 3 Stunden die Entwicklung eines Infarktes, der das laterale Striatum, Teile des medialen Striatums und den angrenzenden Kortex der ipsilateralen geschädigten Hemisphäre betraf. Die Penumbra entwickelte sich im frontalen bis frontoparietalen Kortex. Dies entspricht den Befunden von Memezawa et al. [85] und Belayev et al. [14]. Memezawa et al. [85] verschlossen die A. cerebri media neben 15, 30, 60, 90, 120 min auch wie in unserem Fall für 180 min, um nach 7 Tagen eine

Rezirkulation herbeizuführen. Die Infarktgröße stieg progressiv mit der Verschlußdauer der MCAO an. Nach 180 min Verschlußdauer zeigten sich Infarkte, die fast das gesamte Striatum und große Anteile des von der Ischämie betroffenen Kortex betrafen [85]. So kann im Vergleich der vorliegenden Arbeit mit der Arbeit von Memezawa et al. [85] bestätigt werden, daß diese Möglichkeit des Verschlusses der A. cerebri media nicht zu einem variierenden Zellschaden, sondern zu einem reproduzierbaren Zellschaden im lateralen und partiell im medialen Striatum und im Kortex führt.

Zudem beschichteten wir den intraluminalen Faden, wie Belayev et. al. [14] in ihrer Studie schon beschrieben haben, mit Poly-L-Lysin. Die Poly-L-Lysinbeschichtung sollte die Adhäsion des Fadens an das anliegende Gefäßendothel fördern und auf diese Weise einen besseren Verschluß des Gefäßes gewährleisten. Dies stellte einen Fortschritt im Vergleich zu den Arbeiten von Longa et al. [79] dar, die die Spitze des Fadens über einer Flamme rundeten [14]. Durch die Kombination von dem Benutzten eines Führungskatheters für den Faden und der Poly-L-Lysinbeschichtung zeigten sich in unserem Fall große, konstante Infarkte und eine geringe Variabilität zwischen den einzelnen Versuchstieren.

Viele Arbeitsgruppen beschäftigten sich in früheren Studien mit elektrophysiologischen Untersuchungen und CBF-Messungen [5, 82, 90, 86]. Bolander et al. [23] korrelierten z.B. die Verteilung histopathologischer Signale des Hirnschadens mit Veränderungen von CBF-Werten nach der MCAO nach dem Modell von Tamura [113]. Die Infarktregion machte wie erwartet das laterale Striatum und den angrenzenden Kortex, die perifokale Region Teile des medialen Striatums aus. Sie sahen aufgrund von CBF-Messungen die Möglichkeit „penumbraler Bedingungen“ im Kortex, die für einige Stunden nach dem ischämischen Insult bestehen bleiben [23].

Doch im Unterschied zu o.g. Studien sollte anhand unserer Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen, wie schon von mehreren Studien im Vorfeld beschrieben [33, 35], ein morphologisches Korrelat der Penumbra aufgezeigt werden. Dies war insbesondere durch die GFAP- und die OX 42-Färbungen möglich. GFAP-Färbungen im Periinfarktbereich sind schon von früheren Arbeitsgruppen beschrieben worden [33, 35].

In unserer Studie wurden schon früh nach dem Infarktereignis in den Infarktkernen degenerierende Astrozyten gesehen. In den Penumbraarealen zeigte sich ein Maximum der Anfärbbarkeit GFAP-positiver Astrozyten am 7. postischämischen Tag. Dies entspricht den Beobachtungen von Chen et al. [31], die mit dem Abnehmen GFAP-positiver Astrozyten im Läsionskern ein gleichzeitiges Ansteigen von Astrozyten in der Peripherie bis

166 h nach einem 2-stündigen Verschuß der A. cerebri media nachweisen konnten. Die Astrozyten umsäumten die Infarktareale wie ein Band. Sie waren balloniert und hypertrophiert. Dieses „Astrozytenband“ in der Periinfarktregion spielt in unserer Arbeit insofern eine entscheidende Rolle, da es zur Definition der Penumbra für die weitere Auswertung genutzt wurde.

Die von uns durchgeführten OX 42-Färbungen zur Ermittlung der Verteilung der Makrophagen/Mikroglia im ischämischen Hirngewebe ergaben am 3. postischämischen Tag eine Ansammlung von OX 42-positiven Zellen in den Infarktarealen. Aufgrund der Verteilung dieser Zellen schlossen wir, daß es sich dabei um über die Bluthirnschranke eingewanderte Makrophagen handelt, die ebenfalls wie die Mikrogliazellen des Gehirns mit Hilfe des immunhistochemischen Markers OX 42 darstellbar sind. Am 7. postischämischen Tag zeigte sich eine starke Besiedlung der Penumbrazone mit OX 42-positiven Zellen. Die residenten Mikrogliazellen hatten sich in ihre typische kugelige, amöboide, phagozytoseaktive Form umgewandelt. Dies bestätigte weitgehend die Ergebnisse der immunhistochemischen Studien von Kato et al. [63] und Lehrmann et al. [70]. Kato et al. [63] benutzten neben OX 42 eine Vielzahl von Antikörpern gegen Zelloberflächenmarker auf Mikrogliazellen und auf in das Hirngewebe eingewanderte Neutrophile und Makrophagen. So sahen sie eine Einwanderung von Neutrophilen 1-3 Tage und eine Infiltration von Monozyten/Makrophagen 3-14 Tage nach dem Ischämieereignis in die Infarktareale. Im umliegenden Gewebe zeigte sich nach 7 Tagen eine rapide Aktivierung von Mikrogliazellen mit morphologischen Veränderungen im Vergleich zur ruhenden Glia und eine deutliche Expression OX 42-positiver Zellen im Läsionsrand [63]. Die Gruppe Lehrmann et al. [70] sah ebenfalls zwischen dem 3. und dem 7. Reperfusionstag eine Infiltration des ischämischen Fokus durch OX 42 positive Zellen. Dieser wurde, wie schon mehrfach betont, von einer Periinfarktregion umgeben, in der merklich ein Anstieg von Mikrogliazellen zu verzeichnen war [70]. Morphologische Untersuchungen deckten Gliareaktionen und neuronalen Zelltod in der Penumbra auf [20, 35]. Es läßt sich also zusammenfassen, daß die MCAO als Läsionsmodell in dieser Arbeit soweit bestätigt werden konnte. Im Vergleich zu anderen Arbeiten zeigte sich in den histologischen Arbeiten in der vorliegenden Studie ein ähnliches Ausbreitungsmuster des Zellschadens und der durch die Ischämie aktivierten phagozytoseaktiven Gliazellen des Hirngewebes. Dies stellt die Voraussetzung dazu dar, Untersuchungen über eine postischämische Inflammation und über den neuronalen Zelltod in der Penumbra in Zusammenhang mit einer Zytokinexpression anzustellen.

5.2 Dynamische Veränderungen in der ischämischen Penumbra

Dies ist die erste Arbeit, die sich mit postischämischen dynamischen Prozessen in der Zone der Penumbra mit besonderer Gewichtung auf die Expression von Zytokinen und die Synthese von Stickstoffmonoxidsynthetasen in Neuronen, Mikrogliazellen und Astrozyten beschäftigt.

5.2.1 Die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α

Es liegen noch keine Untersuchungen über die chronologische Aktivierung, die topographische Verteilung und die morphologischen Veränderungen von Entzündungszellen in der Penumbra vor. Deshalb wurde der Zeitverlauf der Expression der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α in der ischämischen Penumbra nach einer MCAO in unserer Studie über den relativ langen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet.

5.2.1.1 Expression von IL-1 β

Mehrere Studien haben im Vorfeld untersucht, inwieweit Interleukin-mRNA nach einer fokalen zerebralen Ischämie im Hirnparenchym produziert wird [28, 76]. Es liegen allerdings noch wenig Daten über die Produktion von Interleukin-mRNA bzw. über die Produktion von Interleukin-Protein in der Zone der Penumbra nach einer fokalen Ischämie vor. Deshalb dienen die Studien, die sich mit der Ausschüttung o.g. Mediatoren im Ischämiekern beschäftigt haben, zur Validierung unserer Ergebnisse, so daß nun auch die Penumbra beurteilt werden kann.

Liu et al. [76] sahen in hypertensiven Ratten eine akute Produktion von IL-1 β -mRNA im ischämischen Kortex mit einem Maximum der Expression nach 12 Stunden nach permanenter MCAO. Unsere Arbeit beschäftigte sich dagegen mit dem Nachweis des IL-1 β -Epitops bzw. in der Regel dann auch des spezifischen Proteins. Dieses entsteht erst in einem späteren Schritt der Proteinbiosynthese der Zytokine, hat aber die Synthese der IL-1 β -mRNA zur Voraussetzung.

Dabei konnten wir beobachten, daß sich bereits am 1. Tag nach der Ischämie in den Infarktkernen und in den Penumbraarealen IL-1 β -positive Zellen anfärbten, die morphologisch an Gliazellen erinnerten und sich in der Nähe von Gefäßen ansiedelten. Diese Zellen zeigten dünne, feine sich verzweigende Ausläufer. Sie ähnelten damit den GFAP-positiven Zellen,

die durch viele lange Fortsätze gekennzeichnet sind und eine Verbindung zu Gefäßen haben.

Ähnliches stellten Davies et al. [36] fest. Sie waren ebenfalls auf der Suche nach der zellulären Lokalisation und der chronologischen und topographischen Verteilung des IL-1 β -Proteins nach permanentem Verschuß der A. cerebri media. Diese Arbeitsgruppe beschränkte sich allerdings auf frühe postischämische Zeitpunkte zwischen 0,5 und 48 Stunden nach einer MCAO. Die sich anfärbenden Zellen erinnerten allerdings im Unterschied zu unserer Studie an Mikroglia und eingewanderte Makrophagen. Davies et al. [36] wiesen ein Ansteigen des Proteins bis 48 h nach der Ischämie im Infarktkern, in den Perinfarktregionen und in der kontralateralen Hemisphäre, die nicht von der Ischämie betroffen war, nach. Das Anfärben von Zellen in der gesunden kontralateralen Hemisphäre wurde auf intrazerebrale Diffusionsprozesse zurückgeführt [36]. Auch in unserer Studie zeigten sich in der kontralateralen, nicht von der Ischämie betroffenen Hemisphäre ab dem 3. postischämischen Tag IL-1 β -positive Zellen mit großen kugeligen Zelleibern und mit z.T. kürzeren, z.T. längeren Fortsätzen, wie sie für amöboide Glia oder für Neurone typisch sind.

IL-1 β kann, wie schon mehrfach erwähnt, theoretisch in Mikroglia, in Astrozyten, in Endothelzellen oder in Neuronen lokalisiert sein [2]. In unserer Studie wurden zwar keine Doppelfärbungen zur genauen Lokalisationsdiagnostik der Zytokinproduktion von IL-1 β durchgeführt. Wir konnten allerdings anhand der schon mehrfach beschriebenen OX 42- und GFAP-Färbungen, welche zur Darstellung von Mikrogliazellen/Makrophagen bzw. von Astrozyten durchgeführt wurden, eine Aktivierung beider Zellpopulationen bis zum 14. postischämischen Tag nachweisen. Dies läßt vermuten, daß aktivierte Mikroglia bzw. aktivierte Astrozyten eine Hauptquelle für IL-1 β innerhalb der Penumbra darstellt, da gerade zu frühen postischämischen Zeitpunkten die Morphologie der IL-1 β -positiven Zellen für Gliazellen spricht.

In der vorliegenden Studie zeigten sich in den Penumbraarealen am 3. postoperativen Tag eine große Anzahl IL-1 β -positive Zellen. Diese Zellen besaßen große, kugelige Zelleiber mit z.T. kürzeren, z.T. längeren Fortsätzen. Bei diesen Zellen zu diesem späteren postischämischen Zeitpunkt schien es sich nun um Gliazellen oder eventuell auch um Neurone zu handeln. Die Expression verstärkte sich bis zum 7. postischämischen Tag und erreichte zu diesem Zeitpunkt ein Maximum. Doch selbst nach zwei Wochen fand noch eine Expression von IL-1 β in der Penumbrazone statt. Die Morphologie der Zellen in dieser späten Phase

erinnerte weiterhin an Gliazellen oder auch an Neurone.

Insgesamt zeigt sich in der Spätphase im Vergleich zur Frühphase der Ischämie ein etwas anderes zellmorphologisches Bild. Während früh nach der Ischämie eher gliaähnliche Zellen mit deutlich sichtbaren Ausläufern sich anfärben, weisen die Zellen zu späteren Zeitpunkten beim Durchfokussieren der Schnitte eher große Perikarien und z.T. kürzere, z.T. längere Fortsätze auf und ähneln somit eher amöboider Glia. Unter den immunpositiven Zellen düften sich auch einige Neurone befinden.

Untersuchungen konnten nachweisen, daß die experimentelle Injektion von IL-1 β in ein durch Ischämie vorgeschädigtes Hirn zu einer Vergrößerung des Ödems und des Infarktes führt [17]. Zur Zeit ist noch nicht geklärt, wie IL-1 β einen Zellschaden verursacht. Zu den möglichen Mechanismen gehören die Aktivierung von Mikroglia oder die Induktion von anderen Zytokinen oder endothelialen Adhäsionsmolekülen und das Freisetzen von freien Radikalen durch die Stimulation des Arachidonsäuremetabolismus oder der Nitritsynthaseaktivität [17].

5.2.1.2 Expression von TNF- α

Buttini et al. [27] wiesen TNF- α -mRNA zu frühen postischämischen Zeitpunkten nach einer MCAO nach. Dabei zeigte sich ein Ansteigen der TNF- α -mRNA-Aktivität nach 30 min in den infarzierten Arealen und in den „Watershed“-Zonen. Sie erfuhr eine Steigerung bis 8 Stunden nach der Ischämie und fiel dann wieder ab. Mit leichter zeitlicher Verzögerung konnte in den gleichen Hirnregionen auch das korrespondierende TNF- α -Protein mit einem Maximum nach 8 bis 24 Stunden nachgewiesen werden. Anhand von Doppelfärbungen und anhand der Zellmorphologie wies diese Arbeitsgruppe eine Expression des Zytokins in Mikrogliazellen in unterschiedlichen Aktivierungsstadien und in eingewanderten Makrophagen nach. Dabei änderte sich die Morphologie der TNF- α -positiven Zellen innerhalb von zwei Tagen von Zellen mit klar sichtbaren zu retrahierten Fortsätzen.

Diese Studie können wir durch unsere Ergebnisse ergänzen. Unser Beobachtungszeitraum erstreckte sich über frühe postischämische Zeitpunkte hinaus. Dabei sahen wir am 1. postischämischen Tag nur vereinzelt TNF- α -positive Zellen im Infarktareal und in der Penumbra. Das Maximum an TNF- α -positiven Zellen verschob sich in unserer Arbeit dagegen auf den 7. Tag nach der MCAO. Die Zellmorphologie erinnerte aufgrund großer, runder Zelleiber mit z.T. kürzeren, z.T. längeren Fortsätzen beim Durchfokussieren der Hirnschnitte ebenfalls an amöboide Gliazellen. Insbesondere am 14. Tag kann man nicht ausschließen,

daß es sich bei den sich darstellenden Zellen auch um Neurone handeln könnte.

Daß auch Neurone postischämisch TNF- α produzieren, bestätigten Liu et al. [75]. Sie sahen anhand von Immunfluoreszenzdoppelfärbungen, daß TNF- α -positive Neurone schon nach 6 bis 12 Stunden im Infarktgebiet und nach 24 Stunden in den umgebenden Gewebebezonen nach der Ischämie erscheinen. Eine Co-Lokalisation von TNF- α und dem Astrozytenmarker GFAP konnte die Arbeitsgruppe nicht nachweisen.

Auch Gong et al. [45] waren auf der Suche nach der zellulären Lokalisation des Proteins TNF- α nach einem permanenten Verschuß der A. cerebri media in Mäusen. Sie zeigten anhand immunhistochemischer Färbungen, daß die TNF- α -Expression in dem ischämischen Kern nach 3 h ansteigt. Nach 6 bis 12 h erscheinen TNF- α -positive Zellen in der Penumbra, um nach 24 h wieder abzufallen. Auch in ihrer Arbeit konnten Doppelfärbungen für TNF- α und für die neuronenspezifische Enolase aufzeigen, daß TNF- α -positive Neurone im ischämischen Kern und in der Penumbra auftauchen.

Wie sich zeigt, wird TNF- α nach der Ischämie rasch hochreguliert. Das Zytokin kann einen Zellschaden durch die verschiedensten Mechanismen wie die Förderung der Leukozytenadhäsion und -infiltration, den Zusammenbruch der Bluthirnschranke, die Bildung von Thromben, die Zytotoxizität gegenüber Gliazellen und Endothelzellen und dem Freisetzen von Nitritoxiden bedingen [38]. Exogen zugeführtes TNF- α vergrößert den Schaden nach fokaler zerebraler Ischämie, wohingegen das Blocken des endogenen Zytokins zu einer Neuroprotektion führt [11].

O.g. Studien zeigen, daß verschiedene Zelltypen die zelluläre Quelle von TNF- α sein können. Zwar können eingewanderte Makrophagen zur postischämischen Produktion von TNF- α beitragen. Allerdings ist auch eine Expression von TNF- α durch residente Gliazellen oder Neurone in Betracht zu ziehen, da TNF- α -mRNA und das korrespondierende Protein viel früher nach einer zerebralen Ischämie ansteigen, als die Infiltration von Makrophagen in das ischämische Hirn beobachtet wird. Wie auch unsere Ergebnisse zeigen, erfährt der Infarktkern erst am 3. postischämischen Tag eine starke Infiltration von OX 42-positiven schmalen, runden, makrophagenähnlichen Zellen aus dem Blut.

5.2.1.3 Expression von IL-6

Wang et al. [118] beschrieben im ischämischen Kern für IL-6-mRNA nach fokaler zerebraler Ischämie eine schnelle und transiente Hochregulation. Diese begann 3 h nach der Ischämie, erreichte das Maximum nach 12 h und verschwand nach 24 h wieder. In unserer

Studie dagegen wurde auch für IL-6 ein Augenmerk auf das IL-6-Epitop selbst gerichtet, für das sich ein anderer Zeitverlauf entwickelte.

Von frühen postischämischen Zeitpunkten an zeigten sich IL-6-positive Zellen, die große, runde Zelleiber besaßen und z.T. Fortsätze trugen, im Infarktareal und in der Penumbra. Dieses Bild blieb bis zum 14. postischämischen Tag insbesondere in den Penumbraarealen bestehen.

IL-6 kann ebenso wie IL-1 β und TNF- α theoretisch in Mikroglia, in Astrozyten, in Endothelzellen oder in Neuronen lokalisiert sein [2]. Hier scheinen es aufgrund der Morphologie und der Verteilung der Zellen wiederum, amöboide Gliazellen und eventuell auch Neurone zu sein. In unserer und in früheren Arbeiten sind schon Gliareaktionen in der ischämischen Penumbra beschrieben worden [70, 33, 35]. Die Gliaaktivierung begann am 1. Tag und hielt bis zum 14. postischämischen Tag an. Es entwickelt sich also nicht nur für IL-1 β und TNF- α ein ähnlicher Zeitverlauf der Zytokinexpression und der Gliaaktivierung in der Penumbra, sondern auch für IL-6 [20].

Im Unterschied zu IL-1 β und TNF- α liegen für IL-6 allerdings Untersuchungen zur genaueren zellulären Lokalisation dieses Zytokins vor. Im Anschluß durchgeführte Doppelfärbungen von Block et al. [20] zeigten, daß OX 42 als Mikrogliamarker und IL-6 örtlich zusammen fallen. Dies unterstützt weiter die Vorstellung, daß aktivierte Glia Zytokine in der Penumbra produziert und damit auch eine Hauptquelle für IL-6 darstellen kann. Doch die Menge an OX 42-positiven Mikrogliazellen übertraf die Menge an IL-6-positiven Zellen [20]. Es exprimieren also nicht alle Mikrogliazellen IL-6. Für den immunhistochemischen Marker GFAP zeigte sich keine Co-Lokalisation zu IL-6. [20].

Insbesondere zu späteren postischämischen Zeitpunkten erinnerte die Morphologie der IL-6-positiven Zellen, wie schon für IL-1 β und TNF- α beschrieben, doch vielleicht eher an Neurone. Die Zellen waren groß und hatten einen runden Zellkörper. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß eben auch Neurone in der Lage sind, Zytokine unter bestimmten Bedingungen zu exprimieren [2].

Für das Zytokin IL-6 konnten in vitro und in vivo Studien eher protektive Eigenschaften aufzeigen [20]. Verschiedene Arbeiten zeigten, daß IL-6 das Überleben von Neuronen des ZNS verbessert und den glutamatinduzierten neuronalen Schaden reduziert [47, 121]. In vivo Experimente deckten z.B. eine Reduktion des durch N-methyl-D-Aspartat (NMDA) induzierten striatalen Zellschadens auf [115]. Die intrazerebroventikuläre Injektion von IL-6 reduzierte das Infarktvolumen, das durch eine fokale zerebrale Ischämie verursacht

worden ist [78]. Allerdings kann eine Überexpression von IL-6 auch zum Zelltod führen. In für IL-6 transgenen Mäusen war die Überproduktion von IL-6 mit Neurodegeneration, Astrozytose, Angiogenese und mit Produktion von Akute-Phase-Proteine verbunden [29].

5.2.2 Die Stickstoffmonoxidsynthetasen i-NOS und n-NOS

Diese Studie hat zwei Isoformen der NOS untersucht: die induzierbare NOS (i-NOS) und die neuronale NOS (n-NOS).

5.2.2.1 Expression von i-NOS

Unsere Studie konnte als erste eine langanhaltende Expression von i-NOS in der ischämischen Penumbra aufzeigen.

Am 1. Tag nach der Ischämie traten zunächst im Infarktkern vereinzelt kleine, rundliche, kräftig angefärbte Zellen auf. Diese Art von Zellen färbten sich auch in der Zone der Penumbra an. Am 3. postischämischen Tag verstärkte sich die Expression der i-NOS-positiven Zellen. Das Anfärbeverhalten der Zellen wechselte zu diesem Zeitpunkt und ähnelte nun den schon beschriebenen IL-1 β -, IL-6 und TNF- α -positiven Zellen. Die Zellen besaßen nun ebenso große, kugelige Zelleiber und z.T. kürzere, z.T. längere Fortsätze. Nachdem sich am 7. Tag ein Maximum der Anfärbbarkeit zeigte, blieb die i-NOS-Expression bis zum 14. postischämischen Tag auf einem relativ hohen Level erhalten.

In einer vorausgehenden Studie konnten Iadecola et al. [59] nach permanenter MCAO i-NOS-mRNA mit einem Maximum der Expression nach 48 Stunden und einem Abfall der Aktivität auf normale Werte nach 7 Tagen im Infarktkern aufzeigen. In dieser Arbeit wurde zudem die i-NOS-Enzymaktivität untersucht. Dabei stellte die Arbeitsgruppe fest, daß i-NOS in der Infarktregion zwischen dem 1. und 2. Tag nach einer MCAO exprimiert wurde, um nach 4 Tagen wieder abzufallen [59]. In einer weiteren Studie von Iadecola et al. [57] nach transienter MCAO konnte eine maximale Produktion von i-NOS-mRNA nach 12 h und ein völliges Verschwinden nach 4 Tagen im ischämischen Kortex beobachtet werden. Die i-NOS-Enzym-Aktivität konnte nach 12 bis 24 h nachgewiesen werden und fiel nach 4 Tagen wieder ab. I-NOS-Immunaktivität wurde in Kapillarwand- und größeren Blutgefäßzellen gesehen. Der Zeitverlauf der i-NOS-mRNA-Aktivität korrespondierte also eng zur i-NOS-Enzymaktivität im Infarktbereich. Zu frühen Zeitpunkten nach 48 bis 96 h nach der Ischämie haben andere Studien zudem „polymorphonuclear leukocytes“ (PMN) im Infarktkern als i-NOS-Quelle ausgemacht [59].

Ashwal et al. konnten das korrespondierende i-NOS-Protein nicht nur im Infarktkern, sondern auch in der Penumbra nachweisen [3]. Dabei zeigte sich im Kern eine höhere Aktivität für i-NOS als in der angrenzenden Periinfarktregion.

In unserer Arbeit konnte man aufgrund der Zellmorphologie der sich anfärbenden Zellen vermuten, daß es sich bei den Zellen um Mikrogliazellen/Makrophagen in der Penumbra handelt, da die Zellen kurze Fortsätze und runde Zelleiber aufwiesen. Die Aktivierung dieser Zellen in der Penumbra ist, wie schon mehrfach betont, neben unserer Studie schon in früheren gesehen worden [70, 33, 35]. Die anhaltende Expression des Mikroglia- und Makrophagenmarkers OX 42 zwischen dem 1. und 14. postischämischen Tag ähnelte dem Zeitverlauf, der sich für den i-NOS-Marker zeigte. Also könnten auch hier Mikrogliazellen/Makrophagen eine Hauptquelle für iNOS darstellen und zum weiteren Zellschaden durch die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) beitragen. Ob es sich bei dieser Zellpopulation auch um Neurone handelt, könnten Doppelfärbungen aufzeigen, denn auch Neurone sind in der Lage, i-NOS unter pathologischen Bedingungen zu produzieren [101]. So kann i-NOS wie die Zytokine in eingewanderten Makrophagen, in aktivierter Glia, in Astrozyten, in Endothelzellen und eben auch in Neuronen lokalisiert sein [101].

Je nach postischämischen Zeitpunkt der Expression von i-NOS werden andere Mechanismen ausgelöst. Sofort nach der Ischämie zeigt i-NOS ein Benefit für das Gewebe, da es die Vasodilatation fördert, die Plättchenaggregation inhibiert und den Blutfluß in der Penumbra steigert. Nach 2 h nach der Ischämie vergrößert i-NOS allerdings den postischämischen Zellschaden. Die i-NOS-Expression kann sich also entweder protektiv oder destruktiv je nach Zeitpunkt nach der Ischämie auswirken [57]. Die verschiedensten Mechanismen wie die Entstehung des stark zytotoxischen Peroxinitrits, die Beeinträchtigung der Energieversorgung und DNA-Schäden sind für die Zytotoxizität von i-NOS verantwortlich [43].

Iadecola et al. [58] zeigten, daß i-NOS-Knockout-Mäuse kein i-NOS-Protein exprimieren und damit einen verminderten neuronalen Schaden und weniger neurologische Defizite im Vergleich zu Wildtypmäusen aufweisen. Diese Untersuchung zeigte, daß die i-NOS-Expression einer der Faktoren darstellt, der zur Expansion des Hirnschadens in der postischämischen Periode beitragen kann. Die i-NOS-Inhibition könnte also eine neue Therapiemöglichkeit darstellen, um insbesondere die sekundäre Progression des Zellschadens zumindestens teilweise einzudämmen.

Der relativ selektive i-NOS-Inhibitor Aminoguanidine reduzierte den Gewebeschaden und die neurologischen Defizite, wenn er 6 h nach der Ischämie verabreicht wurde [57], da

er damit zu dem Zeitpunkt gegeben wurde, an dem auch bekannt ist, daß i-NOS exprimiert wird. In unserer Arbeit sahen wir eine anhaltende i-NOS-Expression bis zum 14. postischämischen Tag in den Penumbraarealen, so daß Studien mit spät und langanhaltenden Gaben von i-NOS-Inhibitoren angeschlossen werden könnten. Nagayama et al. sahen in ihrer Studie mit Aminoguanidine schon eine Reduktion des kortikalen Schadens, wenn es bis zum 3. postischämischen Tag nach der Ischämie gegeben wurde [91, 60].

5.2.2.2 Expression von n-NOS

Wie schon eingangs berichtet, wird die neuronale Stickstoffmonoxidsynthetase (n-NOS) von einer Neuronensubpopulation im ZNS kalziumabhängig konstitutiv exprimiert. In der vorliegenden Studie stellte der immunhistochemische Marker der n-NOS eine Möglichkeit dar, intakte n-NOS-positive Neurone, die durch lange Fortsätze gekennzeichnet sind, und degenerierende n-NOS-positive Neurone mit perlschnurartig verkürzten Fortsätzen voneinander zu unterscheiden.

Studien haben gezeigt, daß die n-NOS eine Rolle in der frühen Phase des ischämischen Zellschadens spielt, da sie schon innerhalb der ersten 10 min eine Expression erfährt, um nach 3 Stunden das Maximum zu erreichen [101].

In unserer Studie wurden ebenfalls zu frühen postischämischen Zeitpunkten in den Infarkt- und Penumbraarealen neben intakten auch degenerierende n-NOS-positive Neurone gesehen. Am 1. postischämischen Tag wiesen die degenerierenden Neurone eine perlschnurartige Verkürzung oder einen völligen Verlust ihrer Fortsätze auf. Die Reaktivität der degenerierenden n-NOS-positiven Neurone in der den Ischämiekern umgebenden Penumbra sank vom 7. bis zum 14. Tag nach der Ischämie. Es ist also eine Neuronensubpopulation in der Periinfarktregion bis zum 14. postischämischen Tag nach einer MCAO von einem selektiven Zellschaden betroffen.

Daß eine neuronale n-NOS-Expression mit Untergang von Zellen in Verbindung stehen kann, zeigen wiederum Studien mit Knockout-Mäusen. Hara et al. [49] untersuchten die Infarktgröße und das postischämische Ödem nach transienter fokaler Ischämie in Mäusen, denen das Gen für die n-NOS-Synthese fehlte. Dabei zeigten sich größere Gewebeschäden und neurologische Defizite bei den Wildtypmäusen. Anhand von MRT-Untersuchungen an n-NOS-Knockout-Mäusen nach permanenter MCAO postulierten Zaharchuk et al. [123], daß eine kleinere Ausdehnung des Periinfarktareals die Folge von geringerer Produktion des zytotoxischen Gases Stickstoffmonoxid darstellt.

Untersuchungen zu frühen postischämischen Gaben von verschiedenen n-NOS-Inhibitoren zeigten eine Reduktion des Infarkt volumens nach Verschluß der A. cerebri media [124, 89]. Anhand dieser Studien konnte ein möglicher zellschädigender Charakter des Enzyms n-NOS aufgezeigt werden.

5.2.3 Zellschaden

Die vorliegende Arbeit sollte sich u.a. insbesondere mit der Frage nach neuronalem Zelltod bis zum 14. postischämischen Tag nach der MCAO in der Periinfarktregion beschäftigen. Dies geschah insbesondere mit Hilfe der TUNEL-Färbungen.

TUNEL-Färbungen detektieren nekrotische bzw. apoptotische Zellen. In unserer Studie wurden im Infarktkern am 1. Tag mehrere TUNEL-positive Zellen gesehen. Am 3. postischämischen Tag färbten sich eine deutlich größere Anzahl an TUNEL-positiven Zellen im Kern an. Dagegen fand erst am 7. bis 14. Tag eine vermehrte Expression TUNEL-positiver Zellen in der Zone der Penumbra statt.

In den Grenzzonen des Infarktes sahen Li et al. [73] nach transienter MCAO apoptotische Zellen schon nach 30 min mit einem Maximum nach 24 bis 48 h. In dieser Studie zeigte sich ebenfalls, daß apoptotische Prozesse noch 4 Wochen nach einer Ischämie anhielten. Dabei stellt sich die Frage, welche Zellarten der Apoptose anheim fallen. Da insbesondere Neurone empfindlich auf eine Ischämie reagieren, dürfte es sich bei diesen Zellen neben Gliazellen und Endothelzellen wohl zum größten Teil um Neurone gehandelt haben. Andere Studien wiesen nach einer MCAO einen selektiven neuronalen Zelltod in der Periinfarktregion selbst nach [71].

Obwohl TUNEL-Studien nicht die Festlegung auf Nekrose oder Apoptose der untergehenden Zellen ermöglichen, so sind doch morphologische Veränderungen, die für Apoptose sprechen, wie Chromatinkondensation, Zellkernschrumpfung und „apoptotic“-Bodies in der Penumbra von Charriaut-Marlangue et al. [30] nachgewiesen worden.

So könnte davon ausgegangen werden, daß zumindestens ein bestimmter Anteil an Neuronen in der Periinfarktregion diesem speziellen programmierten Zelltod zum Opfer fällt.

5.3 Wertung

Eine Beurteilung des Zeitverlaufs der Expression der Zytokine und der Stickstoffmonoxidsynthetasen und einem evtl. daraus resultierenden Zelltod nach einem Mediainfarkt ist an menschlichem Material aufgrund des relativ begrenzten Autopsiematerials schwierig.

In unserer Arbeit konnten Beobachtungen über den relativ langen Zeitraum von 14 Tagen nach einer fokalen zerebralen Ischämie an Nagetieren angestellt werden. Dabei stellte sich heraus, daß die Entzündungsreaktion im Periinfarktbereich über die Akutphase der Ischämie hinaus besteht. Dies ist ein Hinweis für länger anhaltende dynamische Prozesse in der Penumbra, die mit neuronalem Zelltod in Verbindung stehen und zum Untergang potentiell rettbarer Neurone beitragen können.

Wir sahen einen möglichen Zusammenhang zwischen der Zytokinexpression von IL-1 β , IL-6 und TNF- α in der ischämischen Penumbra und dem neuronalen Zellschaden, der mit Hilfe der n-NOS und TUNEL und mit Hilfe der NISSL-Färbungen detektiert wurde. Möglicherweise liegt eine Reduktion von Neuronen in der Penumbrazone bis zum 14. postischämischen Tag vor. Zwar konnten wir o.g. Prozesse zeitlich gesehen parallel beobachten, doch unsere Studie ist noch kein sicherer Nachweis dafür, daß der Zellschaden auch in direktem kausalen Zusammenhang mit der Expression der Zytokine steht. Doch gerade im Hinblick auf die Ergebnisse der zitierten Studien, die auf der einen Seite den Zytokinen IL-1 β und TNF- α eine eher zytotoxische und auf der anderen Seite dem Zytokin IL-6 eine eher neuroprotektive Wirkung zugeschrieben haben, liegt eine Kausalität durchaus nahe. Wie sich zeigte, wurden die Zytokine nach der Ischämie rasch hochreguliert, blieben aber auch bis 14 Tage nach dem Ischämieereignis nachweisbar. In welchen Zellen der Penumbra die Zytokine nun exprimiert wurden, blieb für IL-1 β und TNF- α zunächst unklar. Dafür müßten sich, wie bei IL-6 schon beschrieben, Doppelfärbungen anschließen.

Allerdings konnten wir in unserer Arbeit anhand der Zellmorphologie der sich anfärbenden Zellen schließen, daß es sich bei den Zellen neben Gliazellen auch um Neurone handeln könnte. Dabei traten zu frühen postischämischen Zeitpunkten eher gliaähnliche, zu späten postischämischen Zeitpunkten beim Durchfokussieren der Hirnschnitte eher neuronenhähnliche Zellen mit z.T. kürzeren, z.T. längeren Fortsätzen auf den Plan. Offen bleibt, ob die sich anfärbenden Zellen die Zytokine selbst synthetisiert haben oder ob sie von anderen Zellen synthetisiert wurden und jetzt schon auf einem passenden Rezeptor an der Zelloberfläche sitzen.

Es ist bekannt, daß Zytokinexpression und NOS-Expression eng miteinander verknüpft sind. Hirneigene Zytokine können die zelluläre i-NOS-Expression in Gang setzten, indem sie nach extrazellulär diffundieren und die i-NOS Expression in Entzündungszellen und in lokalem Gefäßendothel bewirken [59]. Bonmann et al. [24] konnten in Zellkulturen aufzeigen, daß IL-1 β in Endothelzellen i-NOS-mRNA und i-NOS-Enzym induziert. Die hohe i-NOS-Aktivität in den zerebralen Endothelzellen muß als eine wichtige Komponente in der Expansion des Zellschadens angesehen werden, da gerade diese Zellen in den ersten Kontakt mit den in das Hirngewebe infiltrierenden Leukozyten involviert sind.

So ist es möglich, daß auch in unserer Studie ein komplexes Zusammenspiel zwischen Inflammation, der Synthese von Stickstoffmonoxidsynthetasen und Zelltod in der ischämischen Penumbra stattgefunden hat, denn es zeigte sich neben der Expression von IL-1 β , IL-6 und TNF- α mit einem Maximum am 7. postischämischen Tag ein zeitgleiches Ansteigen der i-NOS-Synthese. Deshalb könnte auch i-NOS in unserer Studie einen späten Zelltod verursacht haben. Zur Abklärung der genauen zellulären Lokalisation der iNOS-Quelle in unserer Studie gilt das gleiche wie für die immunhistochemischen Marker IL-1 β und TNF- α .

5.4 Mögliche klinische Relevanz

Es stellt sich die Frage, inwieweit unsere tierexperimentelle Studie auch für die Klinik von Relevanz ist und welche Konsequenzen sich daraus ergeben.

Zunächst einmal suggerieren die variierenden zerebralen Blutflußraten der meisten Schlaganfallpatienten und die daraus resultierenden metabolischen und biochemischen Antworten sicherlich, daß ein ischämischer Kern und eine an diesen angrenzende dynamische Penumbra ähnlich der bei Nagetieren auch beim Patienten existiert. Der beste direkte Beweis einer Existenz einer Penumbra auch beim Menschen entstammt neben anderen Untersuchungsverfahren Positronenemissionstomographien (PET) an Schlaganfallpatienten [51, 42, 10].

Verschiedene klinische Studien konnten eine Zytokinproduktion in Zusammenhang mit einem Schlaganfallereignis auch beim Patienten nachweisen. Es wurden erhöhte Plasmaspiegel von Interleukin-6 bei Patienten nach einem akuten Schlaganfall nachgewiesen [13]. Sharif et al. [104] zeigten, daß humane Astrozyten in der Lage sind, die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α zu produzieren. Forster et al. [43] untersuchten, ob i-NOS auch beim Menschen nach einem Schlaganfall exprimiert wird. Die Arbeitsgruppe wies den i-NOS-Marker in Autopsiegehirnen nach Hirninfarkt in Neutrophilen, die das ischämische Gehirn infiltrierten, und in den Blutgefäßen in dem ischämischen Territorium nach. So ist wohl auch das menschliche Gehirn durch zytotoxisches Stickstoffmonoxid (NO) gefährdet.

Es bestehen also durchaus Parallelen zwischen der ischämischen Schädigungskaskade in tierexperimentellen und in klinischen Studien nach einer zerebralen Ischämie.

Neu an unserer Studie ist die Erkenntnis, daß eine Entzündungsreaktion in der Penumbra bis zum 14. postischämischen Tag zumindestens bei Nagetieren existiert. Aus dieser Beobachtung heraus erwächst die Idee, einen Versuch der Reduktion des Zellschadens in der Periinfarktregion durch geeignete antiinflammatorische Pharmaka anzustellen. Die sich anschließenden Untersuchungen sollten zunächst in kontrollierten tierexperimentellen Studien, in letzter Konsequenz aber auch in klinischen Studien durchgeführt werden.

In vorangehenden Studien sind schon Antagonisten proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-1-Rezeptor-Antagonisten [99, 77, 17], TNF- α -Rezeptor-Antagonisten [38] und Rolipram [22] zum Einsatz gekommen. IL-1 β bzw. TNF- α wirken über spezifische IL-1-Rezeptoren [76] bzw. TNF- α -Rezeptoren [38]. Verschiedene Studien zeigten eine Reduktion des Zellschadens bei Gabe o.g. Antagonisten in Tierversuchen [38, 99]. Sie konkurrieren

mit den Zytokinen um die Bindung an den entsprechenden Rezeptor. Block et al. [22] konnten für Rolipram nach globaler Ischämie zeigen, daß die Hemmung der Zytokinsynthese von IL-1 β und TNF- α durch Rolipram zu einer Abnahme des Schadens im Hippokampus führte.

Anti-ICAM-Studien und Anti-MAC-1-Studien zeigten, daß die Gabe von Antikörpern gegen das Adhäsionsmolekül ICAM-1 oder gegen die Glykoproteine CD11b/CD18 zu einer Reduktion des postischämischen Ödems, der Infarktausbreitung und der Infiltration der Neutrophilen in das Infarktgebiet führt [83, 32]. Durch die Antikörpergabe sind die spezifischen Rezeptor-Ligand-Interaktionen zwischen den Leukozyten und den Endothelzellen und eine Migration in das Hirngewebe nicht mehr möglich.

Im Hinblick auf o.g. Studien stellt sich also als neue Therapieoption eine längere Gabe antiinflammatorischer Pharmaka bis 14 Tage nach einem Schlaganfallereignis dar.

5.5 Ausblick

Ein großer Anteil der Schlaganfallpatienten wird erst viele Stunden nach dem Infarkt-ereignis einer adäquaten Therapie zugänglich. Zu diesem späten postischämischen Zeitpunkt können Bemühungen einer Neuroprotektion durch Thrombolyse, Inhibitoren von Glutamatrezeptoren und Kalziumkanalblocker nicht länger effektiv sein. Deshalb sind neue Therapiealternativen von großem Interesse.

Wie eingangs berichtet, setzen die Phasen der Inflammation und der Apoptose erst nach den Phasen der Exitotoxizität und der Periinfarktdepolarisationen ein und halten auch länger, z.T. über Wochen an. In sich anschließenden Studien sind, wie schon mehrfach betont, ein früher Therapiebeginn und eine lange Therapiedauer zu untersuchen, da eine lange postischämische Dynamik in der Penumbra in dieser Studie aufgedeckt werden konnte.

Es existieren verschiedene Angriffspunkte für neuroprotektive Pharmaka in der Schädigungskaskade der zerebralen Ischämie. Antagonisten proinflammatorischer Zytokine sind in dieser Arbeit schon diskutiert worden.

Die Erkenntnis, daß i-NOS im menschlichen Gehirn nach einem Schlaganfallereignis exprimiert wird und das Wissen darum, daß eine Neuroprotektion durch i-NOS-Inhibitoren an Nagetieren beobachtet werden konnte, läßt vermuten, daß i-NOS-Inhibitoren auch eine mögliche Behandlungsstrategie bei Schlaganfallpatienten darstellen könnten [43]. I-NOS-Inhibitoren reduzieren den ischämischen Zellschaden, selbst wenn sie mehrere Stunden nach der Ischämie verabreicht wurden [60, 91]. Wurde der relativ selektive i-NOS-Inhibitor Aminoguanidine 6 h nach der Ischämie verabreicht, reduzierte er den Gewebeschaden und die neurologischen Defizite [57], da er damit zu dem Zeitpunkt gegeben wurde, an dem i-NOS exprimiert wird. Antagonisten der NO-Synthese wie z.B. Lubeluzol reduzieren den durch Zytotoxizität verursachten Zellschaden ebenso [1, 81].

Es läßt sich also zusammenfassen, daß die Gabe von z.B. entzündungshemmenden Pharmaka, wenn aufgrund einer Entzündungsreaktion ein sekundärer Zellschaden erst wie gesehen Stunden bis Tage später in Erscheinung tritt, eine Weitung des kleinen therapeutischen Fensters bedeuten könnte. Dies gilt insbesondere dann, wenn man bedenkt, daß unsere Studie gezeigt hat, daß sich auch nach 14 Tagen noch Entzündungsprozesse in der Penumbra abspielen. Eine antiinflammatorische Therapie müßte also über einen langen Zeitraum eingesetzt werden, um die Infarktausdehnung zu minimieren und um somit die neurologi-

schen Ausfälle für den Patienten zu begrenzen.

Es läßt sich aus der Zahl der an der ischämischen Schädigung des Gehirns beteiligten Mechanismen leicht ablesen, daß eine Monotherapie nur geringe Erfolgsaussichten haben kann. Es dürften insbesondere Kombinationstherapien mit i-NOS-Inhibitoren erfolgversprechend sein. Offen bleibt dabei, wie groß der durch Rettung der Penumbra gewonnene Gewebeanteil zunächst sein wird.

Literaturverzeichnis

- [1] J. Aronowski, R. Strong, and J.C. Grotta. Treatment of experimental focal ischemia in rats with lubeluzole. *Neuropharmacology*, 35(6):689–93, Jun 1996.
- [2] B. Arvin, L.F. Neville, F.C. Barone, and G.Z. Feuerstein. The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 20(3):445–52, Autumn 1996.
- [3] S. Ashwal, B. Tone, H.R. Tian, D.J. Cole, and W.J. Pearce. Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*, 29(5):1037–46, May 1998.
- [4] J. Astrup, B.K. Siesjö, and L. Symon. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*, 12(6):723–5, Nov-Dec 1981.
- [5] J. Astrup, L. Symon, N.M. Branston, and N.A. Lassen. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke*, 8(1):51–7, Jan-Feb 1977.
- [6] T. Back. Pathophysiology of the ischemic penumbra - revision of a concept. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 18(6):621–38, Dec 1998.
- [7] T. Back, M.D. Ginsberg, W.D. Dietrich, and B.D. Watson. Induction of spreading depression in the ischemic hemisphere following experimental middle cerebral artery occlusion: effect on infarct morphology. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16(2):202–13, Mar 1996.
- [8] T. Back, K. Kohno, and K.A. Hossmann. Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCL-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 14(1):12–9, 1994.

- [9] T. Back, W. Zhao, and M.D. Ginsberg. Three-dimensional image analysis of brain glucose metabolism-blood flow uncoupling and its electrophysiological correlates in the acute ischemic penumbra following middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 15(4):566–77, Jul 1995.
- [10] P.A. Barber, S.M. Davis, D.G. Darby, P.M. Desmond, R.P. Gerraty, Q. Yang, D. Jolley, G.A. Donnan, and B.M. Tress. Absent middle cerebral artery flow predicts the presence and evolution of the ischemic penumbra. *Neurology*, 52(6):1125–32, Apr 1999.
- [11] F.C. Barone, B. Arvin, R.F. White, A. Miller, C.L. Webb, R.N. Willette, P.G. Lysko, and G.Z. Feuerstein. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke*, 28(6):1233–44, June 1997.
- [12] K.D. Barron. The microglial cell. A historical review. *Journal of the Neurological Sciences Suppl*, 134:57–68, Dec 1995.
- [13] N.B. Beamer, B.M. Coull, W.M. Clark, J.S. Hazel, and J.R. Silberberger. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. *Annals of Neurology*, 37(6):800–5, Jun 1995.
- [14] L. Belayev, O.F. Alonso, R. Busto, W. Zhao, and M.D. Ginsberg. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke*, 27(9):1616–22, Sep 1996.
- [15] H. Benveniste, J. Drejer, A. Schousboe, and N.H. Diemer. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, 43(5):1369–1374, Nov 1984.
- [16] P. Berlit, O. Popescu, C. Klotzsch, R.R. Diehl, and E. Berg-Dammer. Treatment of acute stroke on the stroke unit. Initial experiences with an acute stroke unit in Germany. *Der Nervenarzt*, 68(2):122–8, Feb 1997.
- [17] A.L. Betz, G.P. Schielke, and G.Y. Yang. Interleukin-1 in cerebral ischemia. *Keio Journal of Medicine*, 45(3):230–7, Sep 1996.
- [18] F. Block. *Funktionelle und morphologische Protektion bei zerebraler Ischämie*. RWTH-Aachen, Mai 1998.

- [19] F. Block, C. Grommes, C. Kosinski, W. Schmidt, and M. Schwarz. Retinal ischemia induced by the intraluminal suture method in rats. *Neuroscience Letters*, 232(1):45–8, Aug 1997.
- [20] F. Block, M. Peters, and M. Nolden-Koch. Expression of IL-6 in the ischemic penumbra. *Neuroreport*, 11(5):963–967, Apr 2000.
- [21] F. Block and M. Schwarz. Neuroprotektion beim Schlaganfall. *Der Nervenarzt*, 70(2):101–110, Feb 1999.
- [22] F. Block, A. Tondar, W. Schmidt, and M. Schwarz. Delayed treatment with rolipram protects against neuronal damage following global ischemia in rats. *NeuroReport*, 8:3829–3832, 1997.
- [23] H.G. Bolander, L. Persson, L. Hillered, R. d’Argy, U. Ponten, and Y. Olsson. Regional cerebral blood flow and histopathologic changes after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 20(7):930–7, Jul 1989.
- [24] E. Bonmann, C. Suschek, M. Spranger, and V. Kolb-Bachofen. The dominant role of exogenous or endogenous interleukin-1 beta on expression and activity of inducible nitric oxide synthase in rat microvascular brain endothelial cells. *Neuroscience letters*, 230(2):109–12, Jul 1997.
- [25] L.L. Bronner, D.S. Kanter, and J.E. Manson. Primary prevention of stroke. *New England Journal of Medicine*, 333(21):1392–400, Nov 1995.
- [26] R. Bullock, A. Zaunders, J. Woodward, and H.F. Young. Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke. *Stroke*, 26(11):2187–9, Nov 1995.
- [27] M. Buttini, K. Appel, P.J. Sauter, A. Gebicke-Haerter, and H.W. Boddeke. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience*, 1:1–16, 1996.
- [28] M. Buttini, A. Sauter, and H. Boddeke. Induction of interleukin-1 β mRNA after focal cerebral ischemia in the rat. *Molecular Brain Research*, 23(1):126–134, April 1994.

- [29] I.L. Campbell, C.R. Abraham, E. Masliah, P. Kemper, J.D. Inglis, M.B. Oldstone, and L. Mucke. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 90(21):10061–5, Nov 1993.
- [30] C. CharriautMarlangue, I. Margaille, A. Represa, T. Popovici, M. Plotkine, and Y. BenAri. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16:186–194, 1996.
- [31] H. Chen, M. Chopp, L. Schultz, G. Bodzin, and J.H. Garcia. Sequential neuronal and astrocytic changes after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Journal of the Neurological Sciences*, 118(2):109–6, Sep 1993.
- [32] M. Chopp, R.L. Zhang, H. Chen, Y. Li, N. Jiang, and J.R. Rusche. Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 25(4):869–876, Apr 1994.
- [33] R.K. Clark, E.V. Lee, C.J. Fish, R.F. White, W.J. Price, Z.L. Jonak, G.Z. Feuerstein, and F.C. Barone. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: An immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Research Bulletin*, 31:565–572, 1993.
- [34] DAKO corp., Carpinteria, CA, USA. *Handbuch II immunchemischer Färbemethoden*, June 1989.
- [35] C.A. Davies, S.A. Loddick, R.P. Stroemer, J. Hunt, and N.J. Rothwell. An integrated analysis of the progression of cell responses induced by permanent focal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Experimental Neurology*, 154(1):199–212, Nov 1998.
- [36] C.A. Davies, S.A. Loddick, S. Toulmond, R.P. Stroemer, J. Hunt, and N.J. Rothwell. The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(1):87–98, Jan 1999.
- [37] D.A. Dawson. Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*, 6(4):299–324, 1994.

- [38] D.A. Dawson, D. Martin, and J.M. Hallenbeck. Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces focal cerebral ischemic injury in the spontaneously rat. *Neuroscience Letters*, 218(1):41–4, Oct 1996.
- [39] G.J. del Zoppo. Microvascular responses to cerebral ischemia/inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 823:132–47, Aug 1997.
- [40] G.J. del Zoppo, G.W. Schmid-Schonbein, E. Mori, B.R. Copeland, and C.M. Chang. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke*, 22(10):1276–83, Oct 1991.
- [41] M.O. Dereski, M. Chopp, R.A. Knight, L.C. Rodolosi, and J.H. Garcia. The heterogeneous temporal evolution of focal ischemic neuronal damage in the rat. *Acta Neuropathologica (Berlin)*, 85(3):327–33, 1993.
- [42] M. Fisher and K. Takano. The penumbra, therapeutic time window and acute ischaemic stroke. *Baillieres Clinical Neurology*, 4(2):279–95, Aug 1995.
- [43] C. Forster, H.B. Clark, M.E. Ross, and C. Iadecola. Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathologica*, 97(3):215–20, 1999.
- [44] J.H. Garcia, K.F. Liu, and K.L. Ho. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke*, 26(4):636–42, Apr 1995.
- [45] C. Gong, Z. Quin, A.L. Betz, X.H. Liu, and G.Y. Yang. Cellular localization of tumor necrosis factor α following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Research*, 801(1-2):1–8, 1998.
- [46] S. Gorres and H.P. Meier-Baumgartner. The epidemiology of stroke. *Zeitschrift für Gerontologie*, 26(6):482–93, Nov-Dec 1993.
- [47] T. Hama, Y. Kushima, M. Miyamoto, M. Kubota, N. Takei, and H. Hatanaka. Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. *Neuroscience*, 40(2):445–52, 1991.
- [48] H. Hara, P.L. Huang, N. Panahian, M.C. Fishman, and M.A. Moskowitz. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric

- oxide synthase after transient MCA occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16(4):605–11, Jul 1996.
- [49] H. Hara, P.L. Huang, N. Panahian, M.C. Fishman, and M.A. Moskowitz. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16(4):605–11, Jul 1996.
- [50] W.D. Heiss and R. Graf. The ischemic penumbra. *Current Opinion in Neurology*, 7(1):11–9, Feb 1994.
- [51] K. Herholz and W.D. Heiss. Positron emission tomography for the determination of pathophysiology of cerebral ischemia. *Arzneimittelforschung*, 41(3):298–303, Mar 1991.
- [52] E.W. Hillhouse, S. Kida, and F. Iannotti. Middle cerebral artery occlusion in the rat causes a biphasic production of immunoreactive interleukin-1 β in the cerebral cortex. *Neuroscience Letters*, 249:177–179, 1998.
- [53] H.C. Hopf, G. Deuschl, H.C. Diener, and H. Reichmann. *Neurologie in Praxis und Klinik*, volume II. Thieme-Verlag, 3 edition, 1999.
- [54] K.A. Hossmann. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Annals of Neurology*, 36(4):557–65, Oct 1994.
- [55] K.A. Hossmann. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*, 8(3):195–208, 1996.
- [56] J.B. Hutchins and S.W. Barger. Why neurons die: cell death in the nervous system. *Anatomical Record*, 253(3):79–90, Jun 1998.
- [57] C. Iadecola, F. Zhang, R. Casey, H.B. Clark, and M.E. Ross. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, 27(8):1373–80, Aug 1996.
- [58] C. Iadecola, F. Zhang, R. Casey, M. Nagayama, and M.E. Ross. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *Journal of Neuroscience*, 17(23):9157–64, 1997.

- [59] C. Iadecola, F. Zhang, S. Xu, R. Casey, and M.E. Ross. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 15(3):378–84, 1995.
- [60] C. Iadecola, F. Zhang, and X. Xu. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *American Journal of Physiology*, 268:286–92, Aug 1995.
- [61] B. Kaplan, S. Brint, J. Tanabe, M. Jacewicz, X.J. Wang, and W. Pulsinelli. Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Stroke*, 22(8):1032–9, Aug 1991.
- [62] H. Kato and K. Kogure. Biochemical and molecular characteristics of the brain with developing cerebral infarction. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 19(1):93–108, Feb 1999.
- [63] H. Kato, K. Kogure, X.H. Liu, T. Araki, and Y. Itoyama. Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Research*, 734(1):203–12, Sep 1996.
- [64] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, and A.R. Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4):239–257, Aug 1972.
- [65] H. Kinouchi, F.R. Sharp, P.H. Chan, J. Koistinaho, S.M. Sagar, and T. Yoshimoto. Induction of c-fos, junB, c-jun and hsp70 mRNA in Cortex, Thalamus, Basal Ganglia and Hippocampus Following Middle Cerebral Artery Occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 14(5):808–817, 1994.
- [66] T. Kirino. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Research*, 239(1):57–69, May 1982.
- [67] P.M. Kochanek and J.M. Hallenbeck. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke*, 23(9):1367–79, 1992.
- [68] J. Koizumi, Y. Yoshida, T. Nakazawa, and G. Ooneda. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in

- which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Japanese Journal of Stroke*, 8:1–8, 1986.
- [69] G.J. Lees. The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *Journal of the Neurological Sciences*, 114(2):119–22, Feb 1993.
- [70] E. Lehrmann, T. Christensen, J. Zimmer, N.H. Diemer, and B. Finsen. Microglial and macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and the striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *The Journal of Comparative Neurology*, 386:461–476, 1997.
- [71] Y. Li, M. Chopp, N. Jiang, F. Yao, and C. Zaloga. Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 15(3):389–97, May 1995.
- [72] Y. Li, M. Chopp, Z.G. Zhang, and R.L. Zhang. Expression of glial fibrillary acidic protein in areas of focal cerebral ischemia accompanies neuronal expression of 72-kDa heat shock protein. *Journal of the Neurological Sciences*, 128:134–142, 1995.
- [73] Y. Li, V.G. Sharov, N. Jiang, C. Zaloga, H.N. Sabbah, and M. Chopp. Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *American Journal of Pathology*, 146(5):1045–51, May 1995.
- [74] M.D. Linnik, R.H. Zobrist, and M.D. Hatfield. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 24(12):2002–9, Dec 1993.
- [75] T. Liu, R.K. Clark, P.C. McDonnell, P.R. Young, R.F. White, F.C. Barone, and G.Z. Feuerstein. Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke*, 25:1481–88, 1994.
- [76] T. Liu, P.C. McDonnell, P.R. Young, R.F. White, A.L. Siren, J.M. Hallenbeck, F.C. Barone, and G.Z. Feuerstein. Interleukin-1 β mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke*, 24:1746–51, 1993.
- [77] S.A. Loddick and N.J. Rothwell. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16(5):932–40, 1996.

- [78] S.A. Loddick, A.V. Turnbull, and N.J. Rothwell. Cerebral interleukin-6 is neuro-protective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 18:176–179, 1998.
- [79] E. Longa, P.R. Weinstein, S. Carlson, and R. Cummins. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20:84–91, 1989.
- [80] I.M. Macrae, D.A. Dawson, J.D. Norrie, and J. McCulloch. Inhibition of nitric oxide synthesis: effects of cerebral blood flow and glucose utilisation in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13(6):985–92, Nov 1993.
- [81] K. Maiese, M. TenBroeke, and I. Kue. Neuroprotection of lubeluzole is mediated through the signal transduction pathways of nitric oxide. *Journal of Neurochemistry*, 68(2):710–4, Feb 1997.
- [82] F.W. Marcoux, R.B. Morawetz, R.M. Crowell, U. DeGirolami, and J.H. Halsey. Differential regional vulnerability in transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, 13:339–346, 1982.
- [83] Y. Matsuo, H. Onodera, Y. Shiga, H. Shozuhara, M. Ninomiya, T. Kihara, T. Tamatani, M. Miyasaka, and K. Kogure. Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Research*, 656(2):344–52, Sep 1994.
- [84] H. Memezawa, H. Minamisawa, M-L. Smith, and B.K. Siesjö. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Experimental Brain Research*, 89(1):67–78, 1992.
- [85] H. Memezawa, M.L. Smith, and B.K. Siesjo. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 23(4):552–9, Apr 1992.
- [86] G. Mies, L.M. Auer, G. Ebhardt, and W.D Traube, H. und Heiss. Flow and neuronal density in tissue surrounding chronic infarction. *Stroke*, 14(1):22–7, Jan-Feb 1983.
- [87] G. Mies, S. Ishimaru, Y. Xie, K. Seo, and K.A. Hossmann. Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion of rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 11(5):753–61, Sep 1991.

- [88] A. Mitani, Y. Andou, S. Matsuda, T. Arai, M. Sakanaka, and K. Kataoka. Origin of ischemia-induced glutamate efflux in the CA1 field of the gerbil hippocampus: an in vivo brain microdialysis study. *Journal of Neurochemistry*, 63(6):2152–64, Dec 1994.
- [89] T. Nagafuji, M. Sugiyama, A. Muto, T. Makino, T. Miyauchi, and H. Nabata. The neuroprotective effect of a potent and selective inhibitor of type I NOS (L-MIN) in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Neuroreport*, 6(11):1541–5, Jul 1995.
- [90] H. Nagasawa and K. Kogure. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 20(8):1037–43, Aug 1989.
- [91] M. Nagayama, F. Zhang, and C. Iadecola. Delayed treatment with aminoguanidine decreases focal cerebral ischemic damage and enhances neurologic recovery in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 18(10):1107–13, Oct 1998.
- [92] K. Overgaard, T. Sereghy, G. Boysen, H. Pedersen, S. Hoyer, and N.H. Diemer. A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 12:484–490, 1992.
- [93] S.K. Park, D. Grzybicki, H.L. Lin, and S. Murphy. Modulation of inducible nitric oxide synthase expression in astroglial cells. *Neuropharmacology*, 33(11):1419–23, Nov 1994.
- [94] G. Paxinos and C. Watson. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sydney, 1986.
- [95] O. Peters, T. Black, U. Lindauer, C. Busch, D. Megow, J. Dreier, and U. Dirnagel. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 18(2):196–205, Feb 1998.
- [96] C.K. Petito, M.C. Chung, L.M. Verkhovsky, and A.J. Cooper. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. *Brain Research*, 569(2):275–80, Jan 1992.
- [97] K. Poeck and W. Hacke. *Neurologie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 10 edition, 1998.

- [98] W.A. Pulsinelli, J.B. Brierley, and F. Plum. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Annals of Neurology*, 11(5):491–8, May 1982.
- [99] J.K. Relton and N.J. Rothwell. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Research Bulletin*, 29:243–246, 1992.
- [100] N.J. Rothwell and J.K. Relton. Involvement of Cytokines in Acute Neurodegeneration in the CNS. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17(2):217–227, 1993.
- [101] A.F. Samdani, T.M. Dawson, and V.L. Dawson. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke*, 28(6):1283–8, Jun 1997.
- [102] A. Schramm. Risikofaktoren des Schlaganfalls unter besonderer Berücksichtigung des Alters. *Zeitschrift für Gerontologie*, 18:216–221, 1985.
- [103] J. Searle, J.F. Kerr, and C.J. Bishop. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathology Annual*, 17:229–59, 1982.
- [104] S.F. Sharif, R.J. Hariri, V.A. Chang, P.S. Barie, R.S. Wang, and J.B. Ghajar. Human astrocyte production of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 following exposure to lipopolysaccharide endotoxin. *Neurological Research*, 15(2):109–12, Apr 1993.
- [105] B.K. Siesjö. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *Journal of Neurosurgery*, 77(2):169–184, Aug 1992.
- [106] B.K. Siesjö, K. Katsura, Q. Zhao, J. Folbergrova, K. Pahlmark, P. Siesjö, and M.L. Smith. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. *Journal of Neurotrauma*, 12(5):943–56, Oct 1995.
- [107] D.L. Small and A.M. Buchan. Mechanisms of cerebral ischemia: intracellular cascades and therapeutic interventions. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 10(1):139–46, Jan 1996.
- [108] B.A. States, J. Honkaniemi, P.R. Weinstein, and F.R. Sharp. DNA Fragmentation and HSP70 Protein Induction in Hippocampus and Cortex Occurs in Separate Neu-

- rons Following Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16(6):1165–1175, 1996.
- [109] H.B. Stähelin, J. Evison, and W.O. Seiler. Prävention des zerebrovaskulären Insults (CVI). *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 124:1995–2004, 1994.
- [110] G. Stoll, S. Jander, and M. Schroeter. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Progress in Neurobiology*, 56(2):149–71, Oct 1998.
- [111] M.I. Sweeney, J.Y. Yager, W. Walz, and B.H. Juurlink. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 73(11):1525–35, Nov 1995.
- [112] L. Symon, N.M. Branston, A.J. Strong, and T.D. Hope. The concepts of thresholds of ischaemia in relation to brain structure and function. *Journal of Clinical Pathology Suppl R Coll Pathol*, 11:149–54, Feb 1977.
- [113] A. Tamura, D.I. Graham, J. McCulloch, and G.M. Teasdale. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1(1):53–60, 1981.
- [114] K. Toku, J. Tanaka, H. Yano, J. Desaki, B. Zhang, L. Yang, K. Ishihara, M. Sakanaka, and N. Maeda. Microglial cells prevent nitric oxide-induced neuronal apoptosis in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, 53(4):415–25, Aug 1998.
- [115] S. Toulmond, X. Vige, D. Fage, and J. Benavides. Local infusion of interleukin-6 attenuates the neurotoxic effects of NMDA on rat striatal cholinergic neurons. *Neuroscience Letters*, 144(1):49–52, Sep 1992.
- [116] Y. Uemura, N.W. Kowall, and M.A. Moskowitz. Focal ischemia in rats causes time-dependent expression of c-fos protein immunoreactivity in widespread regions of ipsilateral cortex. *Brain Research*, 552(1):99–105, Jun 1991.
- [117] M. von Maravic. Acute therapy and prevention of ischemic cerebral infarct. *Zeitschrift für ärztliche Fortbildung Jena*, 89(7):711–8, Dec 1995.

- [118] X. Wang, T.L. Yue, P.R. Young, F.C. Barone, and G.Z. Feuerstein. Expression of interleukin-6, c-fos and zif268 mRNAs in rat ischemic cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 15:166–171, 1995.
- [119] B.D. Watson, W.D. Dietrich, R. Busto, M.S. Wachtel, and M.D. Ginsberg. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Annals of Neurology*, 17(5):497–504, May 1985.
- [120] F.A. Welsh, D.J. Moyer, and V.A. Harris. Regional expression of heat shock protein 70 mRNA and c-fos mRNA following focal ischemia in rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 12:204–212, 1992.
- [121] M. Yamada and H. Hatanaka. Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. *Brain Research*, 643(1):173–80, April 1994.
- [122] Y. Yamasaki, Y. Itoyama, and K. Kogure. Involvement of cytokine production in pathogenesis of transient cerebral ischemic damage. *Keio Journal of Medicine*, 45(3):225–9, Sep 1996.
- [123] G. Zaharchuk, H. Hara, P.L. Huang, M.C. Fishmann, M.A. Moskowitz, B.G. Jenkins, and B.R. Rosen. Neuronal nitric oxide synthase mutant mice show smaller infarcts and attenuated apparent diffusion coefficient changes in the peri-infarct zone during cerebral ischemia. *Magnetic Resonance in Medicine*, 37(2):170–5, Feb 1997.
- [124] Z.G. Zhang, D. Reif, J. Macdonald, W.X. Tang, D.K. Kamp, R.J. Gentile, W.C. Shakespeare, R.J. Murray, and M. Chopp. ARL 17477, a potent and selective neuronal NOS inhibitor decreases infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16(4):599–604, Jul 1996.

Anhang A

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. med. M. Schwarz und bei Herrn Privatdozent Dr. med. F. Block für die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Privatdozent Dr. med F. Block danke ich ganz herzlich für die langjährige Betreuung meiner Arbeit und für die vielen wertvollen, kritischen und anregenden Diskussionen, die wesentlich zum Gelingen meiner Promotionsarbeit beigetragen haben.

Weiter danke Herrn Dr. rer. nat. W. Schmidt für die Unterweisung in die immuno-histochemischen Arbeitstechniken und für die Beratung während der Durchführung und der Auswertung der Versuche.

Herrn Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Dr. med. habil. H. Korr möchte ich für die Übernahme des Korreferates, das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse und die wertvollen Anmerkungen, die der Arbeit die entgeltliche Form gaben, danken.

Schließlich bedanke ich mich bei meinem Mann Oliver, ohne dessen Unterstützung und dessen Geduld diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht entstanden wäre. Mein weiterer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden, die mir in meinem Studium tatkräftig zur Seite standen.

Anhang B

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Peters
Vorname:	Manuela
Geburtsdatum:	19. November 1973
Geburtsort:	Erkelenz
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung:

08/1980 – 06/1984	Katholische Grundschule Erkelenz
08/1984 – 06/1993	Cornelius Burgh Gymnasium Erkelenz
06/1993	Abschluß: Abitur

Hochschulbildung:

10/1993	Aufnahme des Medizinstudiums an der RWTH Aachen
04/1996	Ärztliche Vorprüfung
04/1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/1999 – 08/2000	Praktisches Jahr
11/2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Abschluß des Studiums
seit 01/2001	Ärztin im Praktikum in der Dermatologie, Gemeinschaftspraxis Dres. Dorittke/Kardorff, Mönchengladbach-Rheydt

Dissertation:

1996 – 2001 Zytokinexpression in der ischämischen Penumbra nach transien-
tem Verschluß der A. cerebri media in der Ratte
Neurologische Klinik,
Universitätsklinikum der RWTH Aachen,
Privatdozent Dr. med. Frank Block

Publikationen:

04/2000 Block F., Peters M., Nolden-Koch M.
Expression of IL-6 in the ischemic penumbra.
Neuroreport. 2000 Apr 7; 11(5): 963-7

10/2001 Dihne M., Peters M., Block F.
Interleukin-6 expression in exo-focal neurons after striatal cerebral
ischemia.
Neuroreport. 2001 Oct 8; 12(14): 3143-8