

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Rolle des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Wachstumsfaktors (G-CSF)
bei der postischämischen Rezeptor-Regulation – Untersuchungen am Schlaganfallmodell
G-CSF-defizienter Mäuse

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Stefan Mammele
aus Zweibrücken

Mainz, 2018

Wissenschaftlicher Vorstand:	(in Online-Version gelöscht)
1. Gutachter:	(in Online-Version gelöscht)
2. Gutachter:	(in Online-Version gelöscht)
Tag der Promotion:	09.07.2019

*Für
meine Frau Rachel
und
meine Eltern Hans und Christiane*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis.....	2
Abbildungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung und Fragestellung	4
2. Literaturdiskussion	5
2.1 Schlaganfall	5
2.1.1 Epidemiologie.....	5
2.1.2 Mortalität und Folgen	5
2.1.3 Risikofaktoren und Prävention	6
2.1.4 Einteilung	6
2.1.5 Pathomechanismus und Histologie	6
2.1.6 Symptomatik	8
2.1.7 Diagnostik.....	9
2.1.8 Therapie	9
2.2 Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor	10
2.2.1 Struktur	10
2.2.2 Produzenten von G-CSF	11
2.2.3 Wirkung und Funktion von G-CSF.....	11
2.2.4 Klinische Anwendung.....	13
2.2.5 G-CSF-defiziente Mäuse	14
2.3 Neuroanatomische Aspekte.....	14
2.3.1 Untersuchte Hirnareale.....	14
2.3.2 G-CSF-Defizienz und Infarkt volumina	16
2.3.3 Neurotransmitter-Rezeptoren	17
3. Material und Methoden	19
3.1 Überblick.....	19
3.2 Versuchstiere	19
3.3 G-CSF-Behandlung.....	20
3.4 Anästhesie und MCAO	20
3.5 Dekapitation, Schnittebenen und Gewebelagerung	21
3.6 Silberfärbung und Analyse der Infarkt volumina	22
3.7 <i>In-vitro</i> -Rezeptor-Autoradiographie und Analyse der Ligandenbindung	24
3.8 Statistische Analyse	29
4. Ergebnisse.....	30
4.1 Mortalitätsraten	30
4.2 Infarkt volumina.....	30

4.3 Ligandenbindungsichten.....	30
4.3.1 Ligandenbindungsichten von [³ H]AMPA an AMPA-Rezeptoren.....	30
4.3.2 Ligandenbindungsichten von [³ H]MK801 an NMDA-Rezeptoren.....	34
4.3.3 Ligandenbindungsichten von [³ H]Muscimol an GABA _A -Rezeptoren	37
4.3.4 Ligandenbindungsichten von [³ H]8-OH-DPAT an 5-HT _{1A} -Rezeptoren	40
5. Diskussion	43
5.1 Diskussion der Ergebnisse.....	43
5.1.1 Infarkt volumina	43
5.1.2 Ligandenbindungsichten an AMPA-, NMDA-, GABA _A - und 5-HT _{1A} -Rezeptoren	43
5.2 Diskussion von Material und Methoden.....	44
5.2.1 Verwendetes Schlaganfallmodell	44
5.2.2 Analyse der Infarkt volumina	46
5.2.3 Analyse der Ligandenbindungsichten	46
5.3 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen	47
5.3.1 Ähnlichkeit muriner und humaner Gehirne	48
5.3.2 Alterungsprozesse	49
5.3.3 Begleiterkrankungen.....	49
5.3.4 Komedikation	50
5.3.5 Biphasizität von Neuroprotektiva.....	50
5.3.6 Fazit.....	51
6. Zusammenfassung.....	52
7. Literaturverzeichnis.....	54
Danksagung	61

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
AC	<i>Adjacent Cortex</i> , an den Infarkt angrenzender Kortex
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> , α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropion-Säure
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i> , vom Gehirn stammender neurotropher Faktor
BZ	<i>Border Zone</i> , Grenzzone
CA1, CA2, CA3	Cornu Ammonis Sektor 1, 2 und 3
CT	Computertomographie
DG	Gyrus dentatus
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i> , Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
G-CSF (-/-)	G-CSF-defiziente Tiere
GABA	γ-Aminobuttersäure
IBZ	<i>Immediate Border Zone</i> , unmittelbare Grenzzone
Jak1 und Jak2	Januskinase 1 und 2
MCAO	<i>Medial Cerebral Artery Occlusion</i> , Okklusion der Arteria cerebri media
MRT	Magnetresonanztomographie
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PI 3-kinase-Akt	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase mit Aktivierung von Proteinkinase B
Pir	Piriformer Kortex
Ras-MAPK pathway	<i>Mitogen-activated protein pathway</i> , Mitogen-aktivierter Protein-Signalweg
rt-PA	rekombinanter Gewebe-spezifischer Plasminogenaktivator, Alteplase
S2	Sekundärer somatosensorischer Kortex
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
Src-Kinasen	Sarcoma-Kinasen
STAT-Protein	Signaltransduktoren und Aktivatoren von Transkriptionsproteinen
TIA	Transiente ischämische Attacke
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Korrelation von ischämischem Gebiet und klinischer Symptomatik im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media.....	8
Tabelle 2: Überblick über für diese Arbeit relevante Neurotransmitter-Rezeptoren	17
Tabelle 3: Aufteilung der Versuchstiere.....	19

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Umbra und Penumbra	7
Abbildung 2: Bändermodell von humanem G-CSF	11
Abbildung 3: Struktur des Hippocampus und Lage des sekundären somatosensorischen Kortex im murinen Gehirn.....	15
Abbildung 4: Lage des murinen piriformen Kortex	16
Abbildung 5: Experimentdesign	19
Abbildung 6: In dieser Arbeit verwendete Schnittebenen.....	21
Abbildung 7: Koronare versilberte Schnitte eines unbehandelten G-CSF-defizienten Tieres	23
Abbildung 8: Koronarer Schnitt eines unbehandelten G-CSF-defizienten Tieres auf striataler Höhe..	23
Abbildung 9: Untersuchte Hirnareale auf Höhe des Striatums.....	27
Abbildung 10: Untersuchte Hirnareale auf Höhe des Hippocampus.....	28
Abbildung 11: Farbkodierte [³ H]MK-801-Rezeptor-Autoradiographien eines unbehandelten G-CSF-defizienten Tieres auf Höhe des Striatums und des Hippocampus	29
Abbildung 12: Mittlere korrigierte Infarktvolumina 24 Stunden nach 45-minütiger Ischämie	30
Abbildung 13: Ligandenbindungsdichten von [³ H]AMPA an AMPA-Rezeptoren in der Peri-Infarkt-Region und in ausgewählten Hippocampus-Arealen auf der Seite des Infarktes und kontralateral....	32
Abbildung 14: Ligandenbindungsdichten von [³ H]AMPA an AMPA-Rezeptoren in Kortexarealen im Infarktkern und kontralateral des Infarktes	33
Abbildung 15: Ligandenbindungsdichten von [³ H]MK801 an NMDA-Rezeptoren in der Peri-Infarkt-Region und in ausgewählten Hippocampus-Arealen auf der Seite des Infarktes und kontralateral....	35
Abbildung 16: Ligandenbindungsdichten von [³ H]MK801 an NMDA-Rezeptoren in Kortexarealen im Infarktkern und kontralateral des Infarktes	36
Abbildung 17: Ligandenbindungsdichten von [³ H]Muscimol an GABA _A -Rezeptoren in der Peri-Infarkt-Region und in ausgewählten Hippocampus-Arealen auf der Seite des Infarktes und kontralateral....	38
Abbildung 18: Ligandenbindungsdichten von [³ H]Muscimol an GABA _A -Rezeptoren in Kortexarealen im Infarktkern und kontralateral des Infarktes	39
Abbildung 19: Ligandenbindungsdichten von [³ H]8-OH-DPAT an 5-HT _{1A} -Rezeptoren in der Peri-Infarkt-Region und in ausgewählten Hippocampus-Arealen auf der Seite des Infarktes und kontralateral....	41
Abbildung 20: Ligandenbindungsdichten von [³ H]8-OH-DPAT an 5-HT _{1A} -Rezeptoren in Kortexarealen im Infarktkern und kontralateral des Infarktes	42

1. Einleitung und Fragestellung

Die Therapie und Prophylaxe des ischämischen Schlaganfalles beruhen mit der Thrombolyse, endovaskulären Interventionen, Gerinnungshemmung sowie neuerdings mechanischer Thrombektomie auf Mechanismen, die am Gefäßsystem angreifen. In Anbetracht der hohen Inzidenz, Mortalität und Morbidität des ischämischen Schlaganfalles wären eine Prophylaxe sowie eine neuroprotektive und neuroregenerative Therapie wünschenswert. So wurde in den letzten drei Jahrzehnten intensiv an einer großen Anzahl von Substanzen und Techniken geforscht, bei denen man Hoffnungen hegte, dass sie neuroprotektiv oder -regenerativ wirken. Angriffspunkte für Neuroprotektiva, welche die noch zu Regeneration fähige Penumbra schützen sollen, gibt es viele. Viele der potenziellen Kandidaten sind schon aus dem Rennen, andere noch Gegenstand präklinischer oder klinischer Forschung (Sutherland et al., 2012, Minnerup et al., 2012, Sommer, 2017).

Ein Erfolg versprechender Kandidat ist der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (G-CSF). In Schlaganfall-Modellen an Mäusen konnten neuroprotektive und neuroregenerative Wirkungen von G-CSF demonstriert werden (Six et al., 2003, Schabitz et al., 2003, Gibson et al., 2005, Schneider et al., 2005a). In einer Phase IIa-Studie konnte gezeigt werden, dass die Gabe von G-CSF zwölf Stunden nach einem Schlaganfall sicher ist und von Patienten gut toleriert wird (Schabitz et al., 2010). In einer ersten großen klinischen Phase III-Studie ging die Gabe von G-CSF allerdings nicht mit einer signifikanten Besserung in verschiedenen Schlaganfall-Scores nach 90 Tagen einher (Ringelstein et al., 2013).

Neurone exprimieren den G-CSF-Rezeptor und dieser wird nach Ischämie vermehrt exprimiert (Schabitz et al., 2003). Experimente an Nagern zeigten, dass G-CSF antiapoptotisch wirkt und die Angio- und Neurogenese stimuliert (Minnerup et al., 2009, Komine-Kobayashi et al., 2006, Lee et al., 2005). Weiterhin bewirkt die Gabe von G-CSF in Mäusen und Ratten nach akutem Schlaganfall ein vermindertes Infarktvolumen (Schneider et al., 2005a, Six et al., 2003). G-CSF-defiziente Mäuse zeigten größere Infarkt volumina als Wildtyp-Mäuse. Dieser Effekt konnte in G-CSF-defizienten Tieren durch die Gabe von G-CSF rückgängig gemacht werden (Sevimli et al., 2009).

Die vorliegende Arbeit soll untersuchen, ob der neuroprotektive Effekt des endogenen G-CSF-Systems möglicherweise durch Veränderungen der neuronalen Ligandenbindungsichten exzitatorischer oder inhibitorischer Synapsen im frühen Zeitraum nach fokaler Ischämie vermittelt wird. Dazu wurden 24 Stunden nach 45-minütiger fokaler Ischämie in Gehirnen von Wildtyp-Tieren, G-CSF-defizienten Mäusen und G-CSF-defizienten Mäusen, welchen G-CSF substituiert wurde, Infarkt volumina sowie Ligandenbindungsichten exzitatorischer NMDA- und AMPA-Rezeptoren und inhibitorischer GABA_A- und 5-HT_{1A}-Rezeptoren in Kortexarealen im Ischämiekern, im peri-ischämischen und kontralateralen Kortex sowie in Hippocampus-Arealen untersucht.

2. Literaturdiskussion

2.1 Schlaganfall

Laut Definition der Weltgesundheitsorganisation ist ein Schlaganfall ein sich rasch entwickelndes Zeichen einer fokalen oder globalen Störung der zerebralen Funktion, wobei die Symptomatik 24 Stunden oder länger andauert oder zum Tod führt, ohne dass eine Ursache außer einer vaskulären gefunden werden kann (Sacco et al., 2013). Nach dem klinischen Verlauf wird unterschieden zwischen kompletten Schlaganfällen und transienten ischämischen Attacken, wobei letztere definiert sind als neurologische Symptome vaskulärer Ätiologie, welche sich innerhalb 24 Stunden zurückbilden. Dabei wird davon ausgegangen, dass bei einer Rückbildung von Symptomen innerhalb von 24 Stunden kein bleibender Gehirnschaden vorliegt (Kidwell und Warach, 2003).

In den letzten Jahren wandten sich einige Autoren von dem Begriff TIA ab, mit der Begründung, dass ausreichend detailreiche Bildgebung mit Diffusions-Tensor-Bildgebung zeigte, dass die Mehrzahl aller als TIA diagnostizierter Schlaganfälle mit bleibenden strukturellen Hirnschäden einhergehen (Kidwell und Warach, 2003). Auch tierexperimentelle Daten deuten auf strukturelle Veränderungen auch bei sehr kurzen Ischämieperioden hin (Sommer, 2008).

2.1.1 Epidemiologie

In Industrienationen ist der Schlaganfall die fünfthäufigste Todesursache (Centers for Disease Control and Prevention, 2016), wobei die Inzidenz vor allem in Schwellenländern in den nächsten 20 Jahren ansteigen wird. Weltweit ist mit 87 % die Mehrheit der Schlaganfälle ischämisch bedingt (Donnan et al., 2008).

In der Europäischen Union mit 450 Millionen Einwohnern wird jährlich mit circa einer Million Schlaganfällen gerechnet (Kolominsky-Rabas et al., 2006). Dabei sind Männer mit einer jährlichen Inzidenzrate von 200/100.000 in Deutschland stärker betroffen als Frauen mit 170/100.000. Im höheren Alter steigt das Risiko für einen Schlaganfall deutlich an; 80 % der Schlaganfälle in Deutschland ereignen sich bei über 60-Jährigen. Auf Grund der Alterung der deutschen Bevölkerung wird hierzulande mit einer jährlichen Zunahme der Schlaganfälle von 2 % gerechnet (Kolominsky-Rabas, 2004).

2.1.2 Mortalität und Folgen

Die Sterblichkeit nach einem Schlaganfall liegt in den ersten vier Wochen bei 15 - 20 % (Poock und Hacke, 2006), im ersten Jahr bei circa 40 % (Kolominsky-Rabas, 2004).

Schlaganfälle sind in Industrienationen die führende Ursache für dauerhafte Behinderungen: Von den Patienten, die das erste Jahr nach dem Insult überleben, sind 64 % pflegebedürftig und 15 % müssen

in Pflegeeinrichtungen versorgt werden (Kolominsky-Rabas, 2004). Weiterhin sind Schlaganfälle eine der Hauptursachen für Depression, Demenz, Epilepsie und Stürze (Wolfe, 2000).

2.1.3 Risikofaktoren und Prävention

Zu den nicht modifizierbaren Risikofaktoren für ischämische Insulte gehören hohes Lebensalter, männliches Geschlecht und genetische Disposition für kardio- und zerebrovaskuläre Ereignisse. So verdoppelt sich das Schlaganfallrisiko mit jeder Dekade ab dem 55. Lebensjahr und Männer haben ein 24 bis 30% erhöhtes Risiko. Bei positiver Familienanamnese eines erstgradig Verwandten ist das Risiko um das 1,9-Fache erhöht (Poeck und Hacke, 2006). Eine transitorische ischämische Attacke erhöht das Risiko für einen Schlaganfall in den nächsten fünf Jahren um das 7-Fache (Kuller, 2000).

Die bedeutendsten modifizierbaren Risikofaktoren sind arterielle Hypertonie und Vorhofflimmern, welche das relative Risiko um das 3- bis 5-fache beziehungsweise 6 bis 16-fache erhöhen. Die arterielle Hypertonie spielt auf Grund der höheren Prävalenz in der Bevölkerung die wichtigste Rolle. Sonstige kardiale Erkrankungen, Zigarettenrauchen, Diabetes mellitus, eine asymptotische Karotisstenose sowie Bewegungsmangel und Hyperlipidämie sind weitere modifizierbare Risikofaktoren (Poeck und Hacke, 2006).

Auf diese Faktoren zielt die Primärprävention mit Lebensstiländerungen wie gesunder Ernährung, körperlicher Aktivität, Nikotinabstinenz, moderatem Alkoholgenuß und Stressabbau (Fatahzadeh und Glick, 2006). Von den medizinischen Interventionen sind die Behandlung einer Hypertonie (Goldstein und Hankey, 2006), Therapie mit Antikoagulanzen bei Vorhofflimmern, Endarteriektomie bei Karotisstenosen und Behandlung einer Hypercholesterolemie (Kuller, 2000, Fatahzadeh und Glick, 2006) die wirksamsten.

2.1.4 Einteilung

Die Entscheidung, ob bei einem Patienten ein ischämischer oder hämorrhagischer Insult oder eine Subarachnoidalblutung vorliegt, ist einer der wichtigsten und dringlichsten Schritte in der Behandlung des Schlaganfalles. Diese Einteilung ist nicht an Hand klinischer Befunde, sondern nur durch CT oder MRT vorzunehmen (Donnan et al., 2008).

In Deutschland handelt es sich bei 78 % der Schlaganfälle um ischämische Insulte, in 13 % um hämorrhagische Insulte, in 4 % um Subarachnoidalblutungen und in 6 % ist aufgrund nicht durchführbarer Bildgebung keine Zuordnung möglich (Kolominsky-Rabas, 2004).

2.1.5 Pathomechanismus und Histologie

Ischämische Insulte resultieren aus Gefäßverschlüssen von über 80 % des Gefäßdurchmessers durch Thrombosen der Hirnarterien oder Emboli (Smith et al., 2005). Bevorzugt betroffen sind Äste der Arteria cerebri media oder das gesamte Mediaterritorium (Poeck und Hacke, 2006).

Ursächlich für neurologische Symptome ist die unterbrochene Blut- und damit Sauerstoff- und Glukosezufuhr in einem Hirnareal. Da im Gehirn kein Glykogen gespeichert wird, führt eine Ischämie schon nach wenigen Sekunden zu neurologischen Ausfällen und nach 5 bis 10 Minuten zu Gewebeschäden (Fatahzadeh und Glick, 2006, Smith et al., 2005, Astrup et al., 1981). Im Infarktkern, dem Bereich im Zentrum der Minderdurchblutung, ist dieser Gewebeschaden irreversibel. In der Penumbra, welche den Infarktkern umgibt, ist die Durchblutung auf Grund bestehender Kollateralen noch so hoch, dass die Neurone dort überleben, wenn die Durchblutung innerhalb einer gewissen Zeit wieder vollständig hergestellt ist. Ist dies nicht der Fall, sterben auch die Neurone in der Penumbra ab und werden Teil des infarzierten Bereiches. Die Dauer bis zur irreversiblen Schädigung hängt dabei vom Grad der Abnahme des zerebralen Blutflusses ab (siehe auch 2.3.2, Fisher und Bastan (2012), Astrup et al. (1981)).

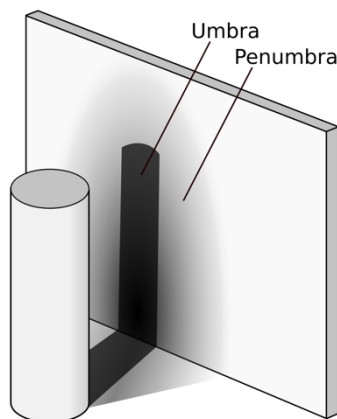


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Umbra und Penumbra.

In ischämischen Hirnarealen fällt der intrazelluläre ATP-Spiegel auf Grund der reduzierten Neusynthese ab und es kommt zur Laktatazidose. Diese wiederum führt zum Verlust des zellulären Ionen-Gleichgewichts, was wiederum zur Freisetzung von Neurotransmittern sowie zur Hemmung der Wiederaufnahme von Neurotransmittern führt. Besondere Bedeutung haben dabei die Glutamat-Rezeptoren AMPA und NMDA (Xing et al., 2012). Die Freisetzung von Glutamat führt über diese Rezeptoren zu einem massiven Einstrom von Calcium. Dieser hat die Aktivierung von Phospholipasen, Proteasen, Lipasen und Nukleasen zur Folge, welche essentielle Zellbestandteile abbauen. Weiterhin kommt es durch die Aktivierung der AMPA- und NMDA-Rezeptoren indirekt auch zum Einstrom von Natrium und Wasser und somit zu Zellschwellung, Ödem und Reduktion extrazellulärer Räume (Lipton, 1999). Reaktive Sauerstoffradikale, welche bei erhöhten intrazellulären Calcium-, Natrium- und ADP-Spiegeln in ischämischen Zellen gebildet werden, schädigen Lipide, Proteine, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren. Diese und andere, hier nicht dargestellte molekularen Mechanismen und Kaskaden münden in einem komplexen Prozess aus Nekrose, Apoptose und Autophagie (Xing et al., 2012).

Weiterhin sind die kortikalen „*spreading depressions*“ an der Schädigung des Hirngewebes nach Ischämie beteiligt. Dabei kommt es ab einem gewissen extrazellulären Kalium-Spiegel zum Zusammenbruch von Ionengradienten, zu beinahe kompletter dauerhafter Depolarisation und damit zum Verlust elektrischer Aktivität sowie zu Zellschwellung und der Zerstörung von Dendritenfortsätzen (Takano et al., 2007, Dreier, 2011).

In Studien mit Positronen-Elektronen-Tomographie beim Menschen wurden Blutflusswerte ermittelt, welche über das Schicksal von Hirngewebe entscheiden: Das Gewebe im Infarktkern, in dem der regionale zerebrale Blutfluss unter 30 % des normalen Wertes (ca. 12 ml/100g/min) liegt, nekrotisiert unweigerlich. In der Penumbra liegt der regionale zerebrale Blutfluss während der ersten 48 Stunden bei 30-45 % des normalen Wertes (ca. 12-18 ml/100g/min). Besteht diese schlechte Sauerstoffversorgung weiter, infarziert auch dieses Gewebe (Heiss und Podreka, 2005, Ferrer et al., 2008).

In Vergleichen zwischen frühem zerebralen Blutfluss und endgültigem Infarktvolumen, welche an Katzen mittels PET und MRT bestimmt wurden, zeigte sich, dass die initiale Penumbra 18 % des endgültigen Infarktvolumens ausmacht. Außerdem macht Gewebe, das ursprünglich ausreichend perfundiert wurde, 12 % des endgültigen Infarktvolumens aus (Heiss et al., 1994).

2.1.6 Symptomatik

Wenn der Zellschaden bei ausreichender Dauer und Schwere der Ischämie zu neurologischen Symptomen führt, liegt ein Schlaganfall vor (Ferrer et al., 2008). Die Symptomatik hängt dabei stark von der Lokalisation des Infarktes ab. So zeigen sich beispielsweise bei Ischämie im Bereich der Arteria cerebri media – die im Rahmen dieser Arbeit experimentell okkludiert wurde – je nach Lokalisation der Schädigung unterschiedliche Symptome (siehe Tabelle 1).

Lokalisation der Schädigung	Symptomatik
Parietallappen kontralateral des Ausfalls	sensible, motorische oder sensomotorische Halbseitensymptome.
Dominanter posteriorer Frontallappen	Motorische Aphasie
Dominanter superiorer Temporallappen	Sensorische Aphasie
Kontralateraler Parietallappen	Verlust des lateralen Gesichtsfeldes

Tabelle 1: Korrelation von ischämischem Gebiet und klinischer Symptomatik im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media.

Neben der Lokalisation hängt die Charakteristik der Schlaganfallsymptome von der Dauer der Okklusion, dem Vorhandensein von Kollateralen, dem arteriellen Blutdruck und der Körpertemperatur ab (Fatahzadeh und Glick, 2006, Klötzsch und Popescu, 2006).

2.1.7 Diagnostik

Neben einer genauen Anamnese, wobei besonders der Zeitpunkt des Symptombeginns sowie dessen zeitlicher Verlauf zu klären ist, und einer körperlichen Untersuchung einschließlich detaillierter neurologischer Untersuchung, sowie einem baldigen Elektrokardiogramm und initialer Laboruntersuchungen hat die bildgebende Diagnostik herausragende Bedeutung (Klötzsch und Popescu, 2006, Jauch et al., 2013). Dabei hat die Computertomographie in der Akutphase des Schlaganfalles eine Schlüsselrolle, da sie die therapeutisch wichtige Unterscheidung zwischen intrazerebraler Blutung und ischämischem Insult ermöglicht und Lokalisation, Alter und Ausdehnung des Infarktes darstellen kann (Klötzsch und Popescu, 2006).

2.1.8 Therapie

Neben Basismaßnahmen stehen als kausal wirksame Therapien des ischämischen Schlaganfalles die Lysetherapie mit rekombinantem Gewebefibrinolyse-Aktivator (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995, Powers et al., 2015) sowie unterschiedliche endovaskuläre Interventionen (Powers et al., 2015, Jauch et al., 2013) zur Verfügung. Trotz intensiver Forschung an neuroprotektiven Substanzen, welche direkt auf Nervenzellen wirken, wurde noch keine in klinischen Studien wirksame Substanz gefunden (Minnerup et al., 2012).

Lysetherapie

Die frühe Rekanalisierung eines Gefäßverschlusses mit frühestmöglich verabreichtem rekombinanten Gewebefibrinolyse-Aktivator ist mit einem stark verbessertem funktionellem Outcome und reduzierter Mortalität assoziiert (Rha und Saver, 2007), wobei die Lysetherapie mit leicht erhöhter Frühmortalität und einem höherem Risiko für Hirnblutungen einhergeht (Wardlaw et al., 2009). Zwischenzeitlich wurde das Zeitfenster für eine Lysetherapie auf 4,5 Stunden ausgedehnt, wobei die Mortalität nicht steigt (Hacke et al., 2008). Rt-PA wurde in Studien mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Tirofiban kombiniert, welcher einer sekundären Thrombusbildung entgegenwirkt. Damit ist die Mortalität etwas niedriger als bei Therapie mit rt-PA alleine, allerdings konnte kein besseres funktionelles Outcome festgestellt werden (Siebler et al., 2011, Zaidat et al., 2018). Das Zeitfenster für Lysetherapie kann möglicherweise durch adjuvante Mittel wie beispielweise G-CSF, verlängert werden (Knecht et al., 2017).

Endovaskuläre Interventionen

Obwohl die zeitnahe Applikation von rt-PA die Basis der Initialbehandlung darstellt, profitieren Patienten mit ischämischem Schlaganfall von mechanischer Thrombektomie. Stent-Retriever sind die Methode der Wahl und sollten bei Erfüllung aller Voraussetzungen möglichst schnell und innerhalb von sechs Stunden ab Symptombeginn angewendet werden (Powers et al., 2015).

Neuroprotektive Substanzen

Neuroprotektion zielt auf den Schutz von Neuronen in der Penumbra ab, dem Bereich um den Infarktkern, in dem Neurone die Minderdurchblutung überstehen können, sofern die Durchblutung innerhalb einer gewissen Zeit wiederhergestellt wird (vergleiche 2.1.5, Minnerup et al. (2012), Sutherland et al. (2012)). Neuroprotektive Substanzen setzen an verschiedenen molekularen Ansatzpunkten in ischämischen Zellen an, wobei für diese Arbeit insbesondere die Glutamat-Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen (vergleiche 2.1.5 und Sutherland et al. (2012)).

Von den vielen Kandidaten für neuroprotektive Therapien hat sich bis jetzt keiner in klinischen Studien als wirksam gezeigt, es laufen allerdings noch Studien zu Neuroprotektiva, die in präklinischen Versuchen vielversprechende Erfolge zeigten. Ein aussichtsreiches neuroprotektives Therapieprinzip ist Hypothermie durch Oberflächenkühlung oder endovaskuläre Kühlung, welche in klinischen Studien als sicher befunden wurde. Daten zum Outcome fehlen allerdings noch (De Georgia et al., 2004, Hemmen et al., 2010).

2.2 Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor

Der Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) ist ein Glykoprotein und Mitglied der Familie der Kolonie-stimulierenden Faktoren, welche die hämatopoetische Zellproliferation und Zelldifferenzierung steuern (Nagata et al., 1986). Da G-CSF für die vorliegende Fragestellung eine elementare Rolle spielt, sollen im Folgenden seine Struktur, Produzenten, Wirkung und Funktion sowie klinische Anwendung kurz dargelegt werden.

2.2.1 Struktur

Humanes G-CSF ist 19,6 kDa schwer und besteht aus 177 Aminosäuren (Schneider et al., 2005b). Im Blut befindet sich an Aminosäure Thr¹³³ eine Sauerstoff-gebundene Gruppe, welche eine Aggregation des Glykoproteins verhindert. Die Struktur von G-CSF hat Ähnlichkeit mit anderen Wachstumsfaktoren wie unter anderem Wachstumshormon, Interferon- β , Interleukin-2 und Interleukin-4. Sie alle bestehen aus vier langen α -Helices, wobei je zwei Helices im Sinne einer *up-up-down-down*-Verknüpfung zueinander parallel verlaufen. Eine fünfte kurze Helix verbindet Helices A und B miteinander (Abbildung 2; Hill et al. (1993)).

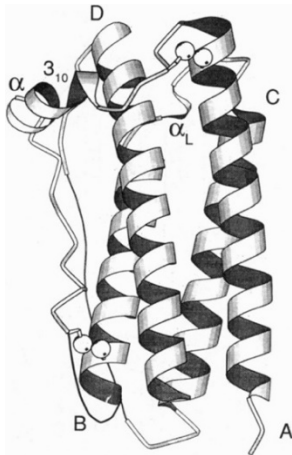


Abbildung 2: Bändermodell von humanem G-CSF. Aus Hill et al. (1993), Copyright 1993 National Academy of Sciences.

2.2.2 Produzenten von G-CSF

Bekannte Produzenten von G-CSF sind Monozyten (Vellenga et al., 1988), Mesothelzellen, Fibroblasten (Koeffler et al., 1987, Kaushansky et al., 1988), und Endothelzellen (Zsebo et al., 1988), wobei Monozyten quantitativ am meisten G-CSF produzieren (Schneider et al., 2005b). Bei diesen Zellen ist die Produktion von G-CSF stark reguliert, nicht konstitutiv (Demetri und Griffin, 1991) und von Stimuli abhängig. Bakterielle Lipopolysaccharide (Vellenga et al., 1988), Interleukin-1, Tumornekrosefaktor- α (Koeffler et al., 1987) und Interleukin-4 stimulieren die Produktion von G-CSF (Wieser et al., 1989).

Weiterhin wird G-CSF von Neuronen im Gehirn produziert und wirkt auf diese. Bei Nagern exprimieren besonders große Neurone im Kortex (vor allem in Schichten 2 und 5), im Hippocampus, in der subventrikulären Zone, im Kleinhirn, im Hirnstamm und im Bulbus olfactorius G-CSF. Stimulus für die Produktion und Exkretion von G-CSF durch Neuronen ist Ischämie (Schneider et al., 2005a, Schneider et al., 2005b).

Auch beim Menschen wird G-CSF und dessen Rezeptor im gesamten zentralen Nervensystem in Neuronen, Gliazellen, Ependymzellen sowie Zellen des Plexus choroideus exprimiert. Dabei ist die Expression von G-CSF insbesondere in Kernen des Hirnstammes sowie des Vorderhirnes ausgeprägt. Im Kortex und im Hippocampus wird eine geringere Expression von G-CSF beschrieben (Ridwan et al., 2014).

2.2.3 Wirkung und Funktion von G-CSF

Der G-CSF-Rezeptor

G-CSF wirkt über den G-CSF-Rezeptor, der Teil der Superfamilie der Hämatoepoetin-Rezeptoren ist und wie andere Zytokin-Rezeptoren aus einer transmembranen Domäne und einer intrazellulären Signal-Transduktionsdomäne besteht (Fukunaga et al., 1990). G-CSF bindet als homo-oligomerer Komplex an

den Rezeptor und aktiviert zytoplasmatische Tyrosinkinasen, unter anderem Janus-Kinasen 1 und 2 sowie mehrere Src-Kinasen. Einige STAT-Proteine, Produkte des Ras-MAPK-Signalweges und des PI 3-kinase-Akt Signalweges wirken dann als Transkriptionsfaktoren (Ward, 2007, Foxwell et al., 1992).

G-CSF-Rezeptoren finden sich auf Vorläufern von neutrophilen Granulozyten, reifen neutrophilen Granulozyten (Demetri und Griffin, 1991), Monozyten (Boneberg et al., 2000) und Blutplättchen (Shimoda et al., 1993). Von diesen Zelltypen haben reife neutrophile Granulozyten die höchste Rezeptorendichte, wobei die Rezeptorendichte mit dem Grad der Zellreife zunimmt. Auf Zellen der erythrozytären oder megakaryozytären Zelllinie finden sich keine G-CSF-Rezeptoren (Demetri und Griffin, 1991).

Weiterhin findet sich der G-CSF-Rezeptor auf nicht-hämatopoetischen Zellen wie Endothelzellen (Bussolino et al., 1989) und einigen malignen Zelllinien wie unter anderem kleinzelligen Lungenkarzinomen, Kolonkarzinomen, Blasenkarzinom und Melanomen. Diese Tumoren produzieren konstitutiv große Mengen G-CSF und könnten die leukämoide Reaktion mancher solider Tumoren erklären (Avalos, 1996, Demetri und Griffin, 1991).

Der G-CSF-Rezeptor findet sich im Gehirn auf Neuronen und neuronalen Stammzellen in den gleichen Arealen, in denen Neurone G-CSF exprimieren: im Kortex (besonders in Schichten 2 und 5), im Hippocampus, in der subventrikulären Zone, im Kleinhirn, im Hirnstamm und im Bulbus olfactorius (Schneider et al., 2005a, Schneider et al., 2005b). Auch beim Menschen wird der G-CSF-Rezeptor in den gleichen Arealen exprimiert wie auch G-CSF; also insbesondere in Kernen des Hirnstammes sowie des Vorderhirnes (Ridwan et al., 2014).

Wirkung auf die Immunantwort und die Hämatopoese

Neutrophile Granulozyten sind wichtige Akteure in der Abwehr bakterieller Infektionen und Pilzinfektionen. G-CSF ist als Induktor der Bildung von Neutrophilen im Knochenmark sowie bei der Induktion der Migration derselben in entzündetes Gewebe ein integraler Bestandteil dieser Abwehr: G-CSF beschleunigt die Zeit der Bildung von Neutrophilen im Knochenmark um das Zehnfache (Hartung, 1998). G-CSF stimuliert in niedrigen Dosen die Proliferation von Vorstufen von neutrophilen Granulozyten, in hohen Dosen auch Vorstufen von Makrophagen und von Granulozyten-Makrophagen (Nicola, 1989).

Weiterhin wirkt G-CSF antiapoptotisch auf reife neutrophile Granulozyten (Hu und Yasui, 1997). Die Stimulation von Monozyten durch Lipopolysaccharide aus bakteriellen Zellwänden bei bakterieller Infektion bewirkt die Induktion des Gens für G-CSF und die Produktion von G-CSF in Monozyten (Vellenga et al., 1988). Die Stimulation von Fibroblasten durch TNF- α und Interleukin-1 führt zur Produktion und Ausschüttung von G-CSF durch diese Zellen, was im Knochenmark die

Granulozytopoese anregt und die Migration von neutrophilen Granulozyten in entzündete Bereiche bewirkt (Koeffler et al., 1987).

Wirkungen im ZNS

Rezeptoren für G-CSF finden sich in den Hirnarealen, in denen G-CSF exprimiert wird, also insbesondere in Kernen des Hirnstammes sowie des Vorderhirnes sowie weniger ausgeprägt im Kortex und im Hippocampus. G-CSF wirkt in diesen Arealen autokrin (Schneider et al., 2005a). Es bewirkt im zentralen Nervensystem die Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu Progenitorzellen und Neuronen, wobei der Pool an undifferenzierten Stammzellen nicht verringert wird. Außerdem wirkt G-CSF durch die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges sowie durch die Dämpfung von apoptotischen Signalwegen des endoplasmatischen Retikulums (Kruger et al., 2007, Schneider et al., 2005b, Menzie-Sudaram et al., 2018).

Somit hat G-CSF im zentralen Nervensystem ähnliche Wirkungen wie in der myeloischen Hämatopoese: die Differenzierung von Stammzellen sowie die Inhibition von Apoptose in reifen Zellen (Schneider et al., 2005b, Schneider et al., 2005a).

Weiterhin bewirkt G-CSF in post-ischämischen Hirnarealen die Bildung von Blutgefäßen (Lee et al., 2005), mobilisiert Stammzellen (Kawada et al., 2006) und hat anti-inflammatorische Effekte (Lundblad et al., 1996).

2.2.4 Klinische Anwendung

G-CSF wird seit Jahrzehnten zur Prophylaxe und Behandlung einer Neutropenie bei Chemotherapie verwendet (Neidhart et al., 1989, Frampton et al., 1994). Auch bei schweren kongenitalen Neutropenien mit erhöhter Anfälligkeit für bakterielle Infektionen wird G-CSF erfolgreich angewandt (Zeidler et al., 2003).

Außerdem wird G-CSF zur Erhöhung der Ausbeute an peripheren CD34⁺-Zellen bei autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation verwendet sowie zur Beschleunigung der Erholung der Granulopoese nach submyeloablativer Chemotherapie (Demirer et al., 2002, Johnsen et al., 1992).

In Tiermodellen verschiedener neurologischer Erkrankungen war die Therapie mit G-CSF erfolgreich: Bei Amyotropher Lateralsklerose verbesserte G-CSF das Outcome in einem Mausmodell (Pitzer et al., 2008), während in einer ersten Pilotstudie am Menschen kein Benefit festgestellt werden konnte (Duning et al., 2011). Bei traumatischer oder sekundärer Verletzung des Rückenmarkes verbesserte sich in einem Mäuse-Modell das Outcome (Pitzer et al., 2010). In einem Parkinson-Tiermodell sowie in einer Phase 1 Studie zeigte sich G-CSF erfolgversprechend in Bezug auf Parkinsonsymptome sowie auf die häufig mit Parkinson einhergehende Depression (Prakash et al., 2013, Tsai et al., 2017). Beim

ischämischen Schlaganfall zeigte sich G-CSF als im Tiermodell vielversprechend, am Menschen war allerdings kein Nutzen dokumentierbar ((Ringelstein et al., 2013, Minnerup et al., 2012)).

2.2.5 G-CSF-defiziente Mäuse

G-CSF-defiziente Mäuse werden mittels gezielter Disruption des G-CSF-Gens in embryonalen Stammzellen durch Deletion der Basenpaare 5-703 erzeugt, was einer Deletion von Exon 1, 2 und einem Großteil von Exon 3 entspricht (Lieschke et al., 1994).

Diese Tiere sind lebensfähig, fruchtbar und wirken auf den ersten Blick gesund. Eine chronische Neutropenie (mit peripheren Neutrophilen-Anteilen von 20-30% derjenigen von Wildtyp-Mäusen) geht mit einer erhöhten Anfälligkeit für *Listeria monocytogenes*-Infektionen und einer reduzierten Steigerung der peripheren Neutrophilen bei Infektionen einher. Dies spricht dafür, dass G-CSF sowohl für normale konstante Blutspiegel von neutrophilen Granulozyten, als auch für eine akute Erhöhung des Neutrophilen-Anteils unabdingbar ist. Nach einmaliger Gabe von G-CSF steigen die Spiegel von Neutrophilen im peripheren Blut weniger stark an als bei Wildtyp-Mäusen. Durch mehrmalige Gabe von G-CSF wird die chronische Neutropenie aufgehoben (Lieschke et al., 1994).

2.3 Neuroanatomische Aspekte

2.3.1 Untersuchte Hirnareale

Sekundärer somatosensorischer Kortex

Der sekundäre somatosensorische Kortex (siehe Abbildung 3) ist Teil des Neocortex, dessen Aufgabe es ist, sensorische Informationen im Kontext bereits gemachter Erfahrungen zu analysieren, zu integrieren und auszuarbeiten sowie passende Reaktionen zu planen und deren Ausführung zu überwachen (Ferezou et al., 2006). Dabei sind bestimmte Regionen bestimmten Fähigkeiten zugeordnet, wobei diese Zuordnung labil und anpassungsfähig ist. Im grundlegenden Aufbau ähneln sich diese funktionellen Kortex-Regionen weitgehend (Watson et al., 2011). Im Folgenden werden Strukturen bei der Maus beschrieben.

Der sekundäre somatosensorische Kortex liegt lateral des primären somatosensorischen Kortex und empfängt Projektionen von diesem und unter anderem vom venteroposterioren Thalamuskern (Viaene et al., 2011, Watson et al., 2011).

Der murine Neocortex besteht aus sieben Schichten: Außen liegt die schmale Schicht 1 (Stratum moleculare), die fast nur aus Axonen tiefer liegender Neurone besteht. Die wenigen Interneurone sind in dieser Schicht weitgehend inhibitorisch. Schicht 2/3 (Strata granulosum externum und pyramidale externum) beherbergt vor allem kleine Pyramidenzellen, welche in andere Kortexareale projizieren. Außerdem finden sich dichte Netze von modulatorischen Interneuronen. Schicht 4 (Stratum granulosum internum) ist besonders in sensorischen Regionen ausgeprägt. Die dortigen Sternzellen

empfangen Projektionen aus dem Thalamus. In Schicht 5 (Stratum pyramidale internum) finden sich große Pyramidenzellen, deren Axone kortikale und subkortikale Ziele erreichen. Schicht 6 (Stratum multiforme) ist relativ ausgeprägt und hat weitgehend Projektionen zum Thalamus, aber auch Afferenzen von diesem. In vielen Kortexarealen der Maus findet sich noch die dünne Schicht 7, welche auch als Schicht 6b in der Literatur beschrieben ist. Aus ihr gehen Efferenzen zu Schicht 1 sowie über das Corpus callosum auf die kontralaterale Hemisphäre ab (Watson et al., 2011).

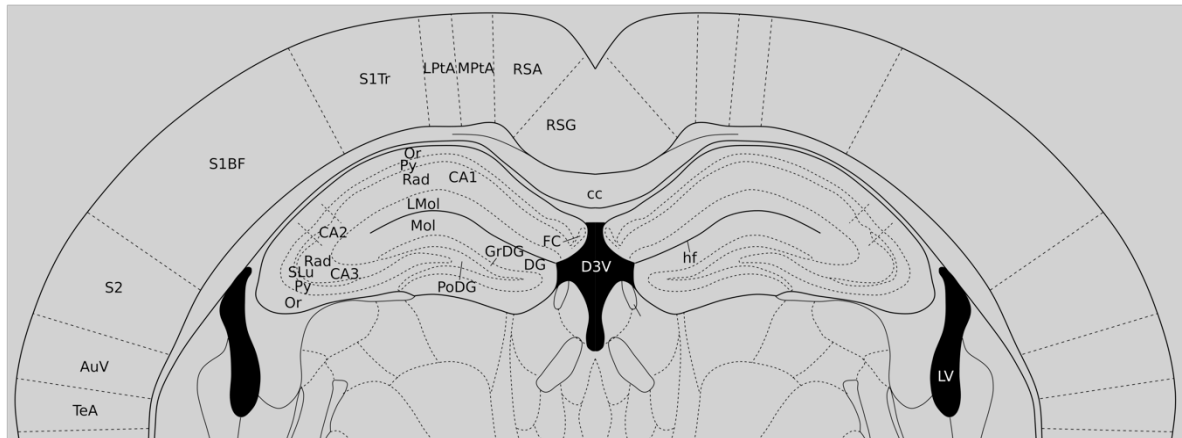


Abbildung 3: Struktur des Hippocampus und Lage des sekundären somatosensorischen Kortex im murinen Gehirn (Ausschnitt aus einem koronalen Schnitt auf Höhe interaural 2 mm). CA1-3: Cornu ammonis 1-3; DG: Gyrus dentatus; Or: Stratum oriens, Py: Stratum pyramidale; Rad: Stratum radiatum; SLu: Stratum lucidum; PoDG: polymorphe Schicht des Gyrus dentatus; GrDG: Granularschicht des Gyrus dentatus; FC: Fasciola cinereum; hf: Fissura hippocampi; RSG: Retrosplenialer granularer Kortex; RSA: Retrosplenialer agranularer Kortex; MPtA: Medialer parietaler Assoziationskortex; LPtA: Lateraler parietaler Assoziationskortex; S1Tr: Stammregion des primären somatosensorischen Kortex; S1BF: Barrel Kortex des primären somatosensorischen Kortex; S2: Sekundärer somatosensorischer Kortex; AuV: Ventraler Anteil des sekundären auditorischen Kortex; TeA: Temporaler Assoziationskortex; D3V: dorsaler Anteil des 3. Ventrikels; LV: Seitenventrikel; cc: Corpus callosum. Modifiziert mit Genehmigung nach Paxinos und Franklin (1997).

Piriformer Kortex

Der piriforme oder olfaktorische Kortex (siehe Abbildung 4) ist Teil des Rhinencephalons. Er dient vermutlich als assoziativer Kortex und weniger als primärer olfaktorischer Kortex. Entlang seiner rostrokaudalen Ausrichtung besteht der piriforme Kortex aus drei Schichten sowie aus dem endopiriformen Nucleus. Angelagert ist außen der laterale olfaktorische Bulbus (Watson et al., 2011).

Unterhalb von Schicht 1, der äußeren molekularen Schicht, befindet sich Schicht 2, die äußere polymorphe Schicht. Diese beinhaltet dichte Populationen von Neuronen. Schicht 3, die Pyramidalzellschicht, beherbergt relativ wenige große Pyramidenzellen (Watson et al., 2011).

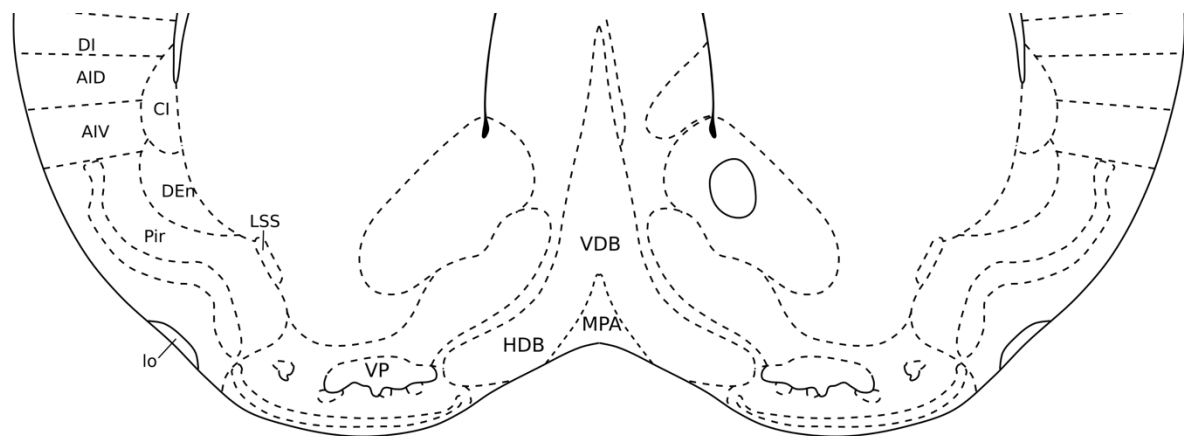


Abbildung 4: Lage des murinen piriformen Kortex (Ausschnitt aus einem koronaren Schnitt auf Höhe interaural 5 mm). DI: AID: Dorsaler Anteil des agranulären Inselkortex; Dysgranularer Inselkortex; AIV: CI: Kaudaler interstitieller Nukleus des Fasciculus longitudinalis medialis; DEn: Dorsaler endopiriformer Nukleus; Pir: Piriformer Kortex; LSS: Lateraler Anteil des Striatum io: lateraler olfaktorischer Kortex; VP: Ventraler Anteil des Pallidum; HDB und VDB: Nuklei des horizontalen Bandes; MPA: Area präoptica medialis. Modifiziert mit Genehmigung nach Paxinos und Franklin (1997).

Hippocampus

Die hippocampale Formation (Abbildung 3) besteht aus drei Teilen: dem Gyrus dentatus, dem nach Lorente de Nó in drei Bereiche unterteilten Cornu ammonis (CA1-3) und dem Subiculum. Der Hippocampus ist an Lernen und Erinnern beteiligt, Informationen scheinen dort allerdings nicht dauerhaft gespeichert zu werden (Schiebler und Korf, 2007).

In dieser Arbeit wurden die Pyramidalzellschicht, welche die Zellschicht des Cornu ammonis darstellt, sowie die dendritischen Schichten des Cornu ammonis, also die Strata orientale und radiale sowie im CA3 zusätzlich das Stratum lucidum untersucht. Im Gyrus dentatus wurden die Molekular- und die Körnerzellschicht untersucht.

2.3.2 G-CSF-Defizienz und Infarktvolumina

Die Applikation von G-CSF nach experimenteller transienter fokaler Ischämie mittels Okklusion der Arteria cerebri media hat bei Ratten und Mäusen die Reduktion von Infarktgrößen und neurologischen Symptomen zur Folge, wenn G-CSF 0,5 bis sechs Stunden nach Ischämie appliziert wird (Schabitz et al., 2003, Gibson et al., 2005, Lee et al., 2005, Schneider et al., 2005a, Komine-Kobayashi et al., 2006, Solaroglu et al., 2006, Sehara et al., 2007). Reduktionen im Infarktvolumen konnten bei Applikation

von G-CSF auch 24 Stunden (Shyu et al., 2004) und sogar bis zu 4 Tage (Lee et al., 2005) nach Ischämie beobachtet werden.

In dem Experiment dieser Arbeitsgruppe, das dem in dieser Arbeit beschriebenen Experiment vorausgeht, wurden an G-CSF-defizienten Mäusen Infarktvolumina 48 Stunden nach Ischämie bestimmt. Als Kontrollen dienten dabei, wie in der vorliegenden Arbeit, Wildtyp-Tiere sowie G-CSF-defiziente Mäuse, denen G-CSF vor Ischämie appliziert wurde. G-CSF-defiziente Mäuse hatten signifikant größere Infarktvolumina. Dieser Effekt wurde durch G-CSF-Substitution aufgehoben: G-CSF-defiziente Tiere, denen vor experimenteller fokaler Ischämie G-CSF substituiert wurde, hatten kleinere Infarktvolumina ($23,9 \pm 2,4 \text{ mm}^3$) als G-CSF-defiziente Tiere ohne G-CSF Gabe ($45,1 \pm 3,9 \text{ mm}^3$; Sevimli et al. (2009)).

Um unter anderem die Frage zu beantworten, wie es zu den erhöhten Infarktvolumina in G-CSF-defizienten Tieren kommt, wurde das in dieser Arbeit dargelegte Experiment konzipiert und die Methode der Rezeptor-Autoradiographie gewählt. Dabei wurde ein früherer Untersuchungszeitpunkt von 24 Stunden nach Ischämie gewählt.

2.3.3 Neurotransmitter-Rezeptoren

Die für diese Arbeit relevanten Rezeptoren (siehe Tabelle 2) und deren Rolle bei Ischämie sollen im Folgenden erörtert werden.

Rezeptor	Physiologischer Ligand	Agonist	Post-synaptisches Potential
Glutamat	L-Glutamat und Aspartat	AMPA, NMDA, ATPA, Kainat	Exzitatorisch
GABA _A	GABA	GABA	Inhibitorisch
5-HT _{1A}	Serotonin	U.a. Repinotan	Inhibitorisch

Tabelle 2: Überblick über für diese Arbeit relevante Neurotransmitter-Rezeptoren, deren Liganden und Agonisten sowie deren post-synaptisches Potential (Vergleiche Zhou und Danbolt (2014), Olsen und Tobin (1990), Filip und Bader (2009)).

Glutamat-Rezeptoren finden sich im gesamten ZNS. Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter. Es bindet an nach dem jeweiligen Agonisten benannten Rezeptoren, nämlich an NMDA-, AMPA-, und Kainat-Rezeptoren (Dingledine et al., 1999, Zhou und Danbolt, 2014). Die Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren spielt bei vielen neurodegenerativen Prozessen eine wichtige Rolle. Diese Exzitotoxizität der Glutamat-Rezeptoren ist bei AMPA-Rezeptoren am stärksten ausgeprägt, gefolgt von NMDA- und Kainat-Rezeptoren (Kristensen et al., 2001).

So sind die negativen Effekte AMPA-induzierter Exzitotoxizität in der frühen post-ischämischen Phase bekannt, wobei diese durch pharmakologische Blockade von AMPA-Rezeptoren reduziert werden können (Szenasi et al., 2008).

Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren in der chronischen Phase nach Ischämie eine Voraussetzung für erfolgreiche Regeneration und verbessertes neurologisches Outcome ist (Carmichael, 2012). Entsprechend zeigte sich einige Wochen nach photothrombotisch induzierter Ischämie an Ratten, die mit BDNF oder Citicolin behandelt wurden und ein besseres neurologisches Outcome zeigten, eine vermehrte Ligandenbindung an NMDA- und AMPA-Rezeptoren (Muller et al., 2008, Diederich et al., 2012).

GABA_A-Rezeptoren stellen die häufigsten inhibitorischen Rezeptoren in höheren Strukturen des zentralen Nervensystems (Olsen und Tobin, 1990). Die Blockade von GABA_A-Rezeptoren in einem Schlaganfall-Modell an Mäusen verhinderte 30 Tage nach Ischämie eine Beeinträchtigung der Langzeit-Potenzierung im Hippocampus. Die Abschwächung GABAerger Aktivität wird somit als möglicher Ansatz zur Therapie oder Prophylaxe von kognitiver Beeinträchtigung in der chronischen Phase nach ischämischem Schlaganfall diskutiert (Li et al., 2013). Dieser Ansatz zeigte in einer kleinen klinischen Studie Erfolge in Bezug auf die Erholung motorischer Funktionen nach ischämischem Schlaganfall (Kim et al., 2014).

Andererseits hat die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren in der akuten Phase nach Ischämie – gemeinsam mit Glycin-Rezeptoren – nach fokaler zerebraler Ischämie bei Ratten ebenfalls neuroprotektive Wirkung (Wang et al., 2007).

Serotonin-Rezeptoren sind, je nach Subtyp, inhibitorisch oder exzitatorisch. Inhibitorische 5-HT₁-Rezeptoren finden sich vor allem im Hirnstamm und dort besonders in den Raphekernen (Filip und Bader, 2009). Der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonist Repinotan zeigte in Schlaganfallmodellen an Nagern neuroprotektive Effekte, wobei in einer ersten klinischen Studie kein therapeutischer Nutzen feststellbar war (Berends et al., 2005). Der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonist S14671 zeigte neuroprotektive Wirkung durch die Induktion von Hypothermie in Ratten (Johansen et al., 2014). Für selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer gibt es keine ausreichenden Belege dafür, dass diese Infarkt volumina in Schlaganfallmodellen verringern (McCann et al., 2014).

3. Material und Methoden

3.1 Überblick

Für die vorliegende Arbeit wurden drei Gruppen von Tieren randomisiert und verblindet untersucht: Wildtyp-Tiere, G-CSF-defiziente Tiere und G-CSF-substituierte G-CSF-defiziente Tiere. Den Tieren in letzterer Gruppe wurde über vier Tage zweimal täglich G-CSF subkutan in einer Dosis von 250 µg/kg appliziert. Am 5. Tag wurden die Tiere anästhesiert und es wurde mittels eines Monofilaments die Arteria cerebri media über 45 Minuten okkludiert. 24 Stunden nach MCAO wurden die Tiere tief anästhesiert und dekapitiert. Serielle Hirnschnitte wurden versilbert und die Infarkt volumina bestimmt. Schnitte auf Höhe des Striatums und des Hippocampus wurden für *in-vitro*-Rezeptor-Autoradiographien verwendet. Abbildung 5 gibt einen Überblick über das Experiment.

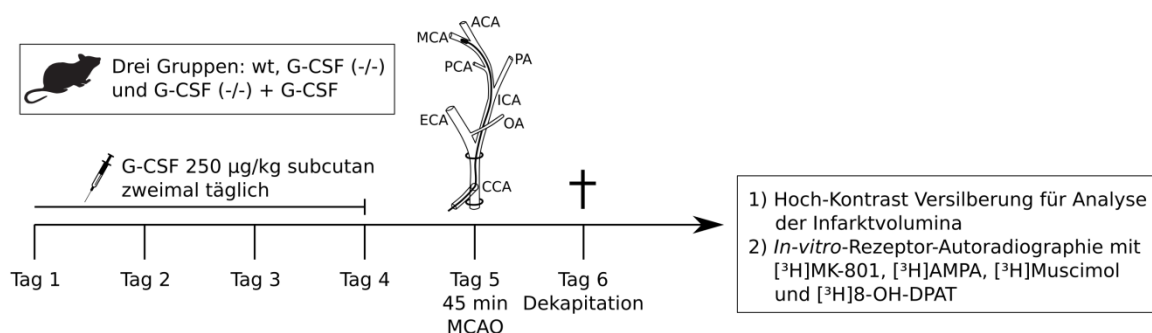


Abbildung 5: Experimentdesign.

3.2 Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden 52 weibliche Tiere verwendet: 23 Wildtyp-Mäuse und 29 G-CSF-Knockout-Mäuse. Diese wurden in drei Gruppen aufgeteilt (Tabelle 3).

Gruppen und Tiere	Gesamt	Verstorben	Anderweitig verwendet*	Untersucht
Wildtyp-Mäuse	23	4	-	19
G-CSF (-/-)	17	3	1	13
G-CSF (-/-) + G-CSF	12	2	2	8
<i>Gesamt</i>	52	9	3	40

Tabelle 3: Aufteilung der Versuchstiere in drei Gruppen, verstorbene Tiere und nicht verwendete Gehirne sowie die Zahl der untersuchten Gehirne. *Drei Gehirne wurden für Analysen zu oxidativem Stress reserviert.

Die Personen, die das Experiment, die Bildanalysen und die Statistik durchführten, waren in Bezug auf die Zugehörigkeit der Tiere zu den drei Gruppen verblindet.

Alle Mäuse wogen 20-30 Gramm und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Jeweils zwei Tiere wurden in Macrolon-Käfigen unter kontrollierten Umweltbedingungen gehalten. Es wurde eine Umgebungstemperatur von 22° C mit zwölf-stündigen Tag und Nacht-Zyklen aufrechterhalten, wobei die Lichtquellen um 7:00 Uhr angeschaltet wurden. Zwei Wochen vor Beginn der Experimente wurden die Tiere täglich von dem die Experimente Durchführenden „gehandelt“.

Alle Experimente wurden gemäß den Vorgaben der Europäischen Union zu Tierversuchen (Richtlinie 86/609/EWG des Rates vom 24. November 1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere) durchgeführt (Europäischer Rat, 1986). Der Genehmigungsantrag für Tierversuche wurde von der Ethik-Kommission Münster genehmigt (Aktenzeichen 50.0835.1.OG 84/2006).

Die G-CSF-defizienten und Wildtyp Auszucht-Mäuse stammten von Zuchtlinie C57BL/6J und 129 Inzuchtlinien (The Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609, USA).

Drei Gehirne (ein Gehirn eines unbehandelten G-CSF-defizienten Tieres und zwei Gehirne aus der Substitutionsgruppe) wurden für Untersuchungen zu oxidativem Stress reserviert. Diese Gehirne wurden nicht für die hier dargestellten Untersuchungen verwendet.

Alle Tierversuche wurden von Mitarbeitern der Abteilung Neurologie der Universität Münster durchgeführt.

3.3 G-CSF-Behandlung

Zwölf der 29 G-CSF-defizienten Mäusen wurde vier Tage vor MCAO zweimal täglich 250 µg/kg G-CSF subkutan appliziert. Es wurde rekombinantes humanes G-CSF (Neupogen, Amgen Inc., One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA, USA) verwendet.

3.4 Anästhesie und MCAO

An Tag 5 wurde bei allen Mäusen die Arteria cerebri media transient okkludiert. Die Tiere wurden hierzu mit zweiprozentigem Halothan (in 70% Stickstoffmonoxid und 30% Sauerstoff) anästhesiert, die Anästhesie wurde dann mit einprozentigem Halothan aufrechterhalten.

Es wurde eine modifizierte Technik der MCAO angewandt (Hata et al., 1998): Nach einem medianen Einschnitt im Halsbereich wurden die linke Arteria carotis communis und interna isoliert und ligiert. Die Arteria carotis interna wurde vorübergehend mit einem mikrovaskulären Clip verschlossen. Anschließend wurde ein mit Silikon (Xantopren; Heraeus, Alte Heerstraße, 41540 Dormagen,

Deutschland) beschichtetes 8-0 Nylon Monofilament (Ethilon; Ethicon, Hummelsbütteler Steindamm 71, 22851 Norderstedt, Deutschland) in die Arteria carotis communis eingeführt und bis zu einer Lage von 9 mm distal der Bifurkation der Karotis vorgeschoben.

Während des Eingriffes wurde der zerebrale Blutfluss mit Hilfe eines Laserdopplergerätes (Periflux 5001; Perimed, Datavägen 9A, 175 43 Järfälla, Schweden) bestimmt, um Ischämie und Reperfusion sicherzustellen. Die rektale Körpertemperatur der Tiere wurde mittels einer Thermostat-kontrollierten Wärmeplatte konstant auf $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ gehalten.

Nach 45 Minuten Okklusion wurde das Monofilament zur Reperfusion zurückgezogen.

3.5 Dekapitation, Schnittebenen und Gewebelagerung

24 Stunden nach Okklusion der Arteria cerebri media wurden die Tiere tief anästhesiert und dekapitiert. Die unfixierten Gehirne wurden vorsichtig entnommen, umgehend in Isopentan bei -20°C eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Gehirne wurden für die Analyse der Infarkt volumina und für die *in-vitro*-Rezeptor-Autoradiographie in einem Kryostat bei -20°C in $20 \mu\text{m}$ dicke koronare Schnitte geschnitten und auf mit 3-(Triethoxysilyl)-propylamin beschichtete Objektträger aufgebracht. Abbildung 6 stellt die Schnittebenen schematisch dar.

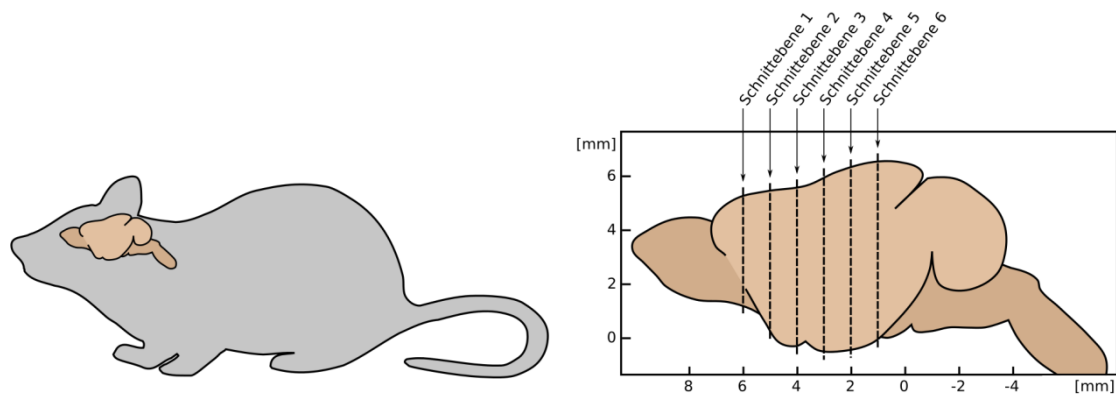


Abbildung 6: In dieser Arbeit verwendete Schnittebenen. Von 6 Schnittebenen im Abstand von 1 mm, beginnend bei Punkt interaural 6 mm, wurden jeweils drei $20 \mu\text{m}$ dicke Schnitte für die Silberfärbungen verwendet. Von Schnittebenen 2 und 5 wurden zusätzlich jeweils 15 Schnitte für die Rezeptor-Autoradiographien gefertigt.

3.6 Silberfärbung und Analyse der Infarkt volumina

Beginnend auf Höhe 6,0 mm interaural (Paxinos und Franklin, 2001), wurden 20 µm dicke Schnitte im Abstand von 1 mm gefertigt und mittels Hochkontrast-Silberfärbung gefärbt (Vogel et al., 1999):

Die Silberimprägnierungslösung wurde zubereitet, indem zu 10 mL Lithiumcarbonatlösung (gesättigte Lösung 0,6g Lithiumcarbonat in 50mL aqua purificata) 5mL 10-prozentige Silbernitratlösung gegeben wurde. Das entstandene Präzipitat wurde durch tropfenweises Hinzufügen von 25-prozentiger Ammoniaklösung aufgelöst, wobei gerade so viel Ammoniak hinzugegeben wurde, dass die Lösung klar wurde. Abschließend wurden 75mL Aqua purificata zugefügt. Die Lösung wurde bis zum Gebrauch unter Lichtverschluss gehalten.

Für die Zubereitung der Entwicklerlösung wurden 20mL 37-prozentige Formaldehydlösung mit 70mL Aqua purificata gemischt. Es wurde 0,3g Hydrochonin in 15mL Aceton aufgelöst und der Formaldehydlösung hinzugefügt. Nachdem 1,1g Trinatriumcitrat-Dihydrat zugegeben wurden, wurde die Lösung bei Raumluft circa 30 Minuten stehen gelassen, bis sie sich kupfern färbte.

Für die Färbung wurden Schnitte auf Superfrost-Objektträgern verwendet. Die Kryostatschnitte wurden zehn Minuten lang luftgetrocknet, dann zwei Minuten in die Silberimprägnierlösung eingetaucht, sechsmal jeweils eine Minute mit Aqua purificata gespült, drei Minuten in die Entwicklerlösung gegeben, luftgetrocknet und abschließend mit Cytoseal (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA) eingedeckt.

Die Lösungen wurden kurz vor Gebrauch angesetzt, da sie nach etwa 90 Minuten ihre Aktivität verlieren.

Die Schnitte wurden unter konstanten Lichtbedingungen mit einer Kamera aufgenommen und digitalisiert (Roper Scientific, Photometrics CoolSNAP™, Ottobrunn/München). Infarkt- und Hemisphärengrenzen wurden mit MCID Basic Version 7.0 (MCID Image Analysis Software Solutions for Life Sciences, Imaging Research Inc., St. Catharines, Ontario, Kanada) am Computerbildschirm eingezeichnet (wie beschrieben in Frauenknecht et al. (2010)). Abbildung 7 zeigt beispielhaft alle versilberten Schnitte eines unbehandelten G-CSF-defizienten Tieres.

Infarkt volumina und Volumina der ipsi- und kontralateralen Hemisphären wurden mit folgender Formel bestimmt, wobei der Schichtabstand 1 mm betrug:

$$Volumen = Fläche_{Schnitt\ 1} + Fläche_{Schnitt\ 2} + \dots + Fläche_{Schnitt\ n} \times Schichtabstand$$

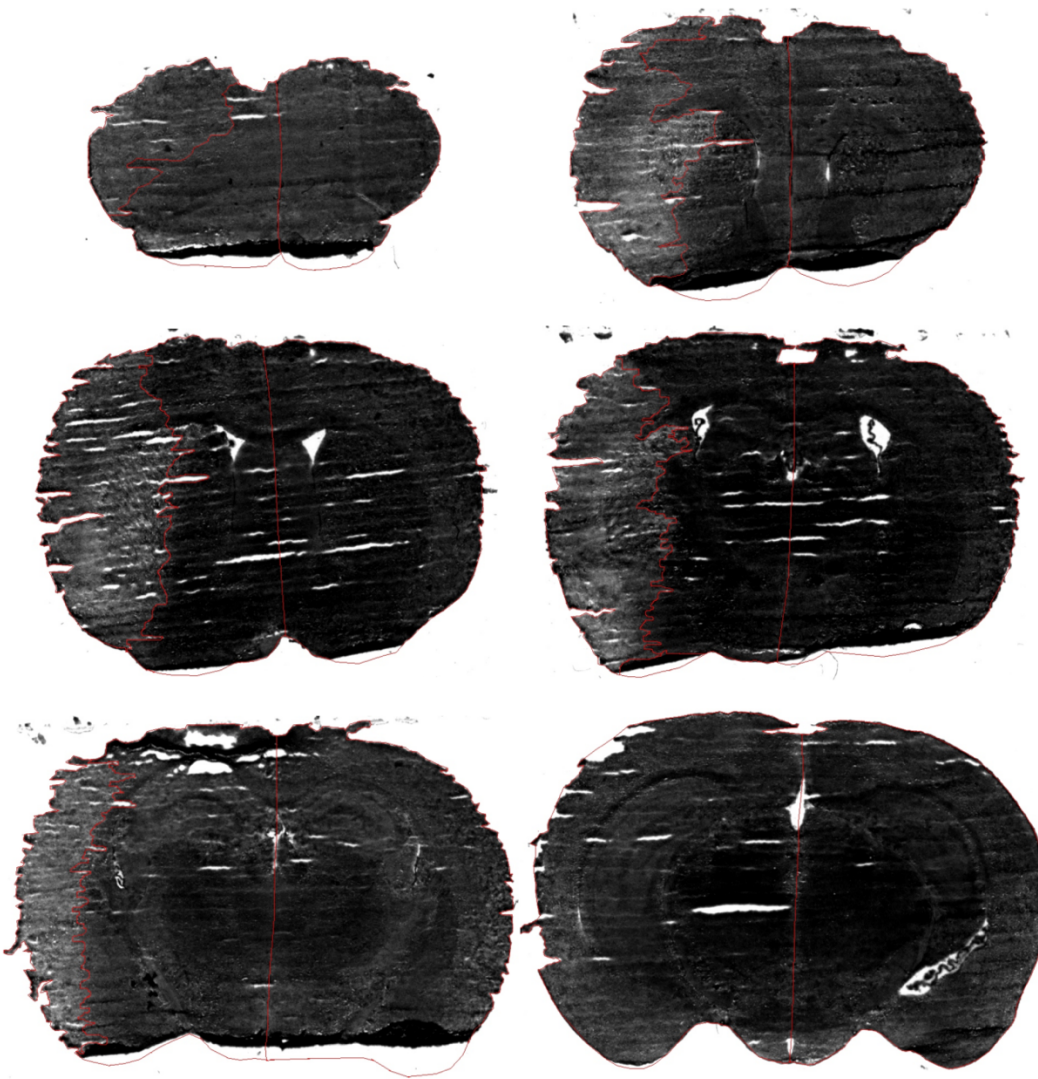


Abbildung 7: Koronare versilberte Schnitte eines unbehandelten G-CSF-defizienten Tieres. Das Infarktareal stellt sich heller dar. In Rot: Infarkt- und Hemisphärgrenzen.

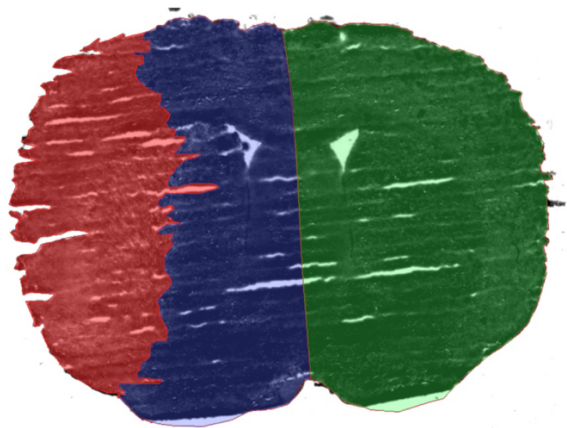


Abbildung 8: Koronarer Schnitt eines unbehandelten G-CSF-defizienten Tieres auf Höhe des Striatums. Das infarzierte Areal ist rot, die restliche ipsilaterale Hemisphäre blau und die kontralaterale Hemisphäre grün eingefärbt.

Für das Infarktvolumen wurde mittels folgender Formel eine Ödemkorrektur durchgeführt (Belayev et al., 2003), wobei die Schriftfarben in der Formel analog zu Abbildung 8 sind:

$$\text{Volumen}_{\text{korrigiert}} = \text{Volumen}_{\text{Infarkt}} \times \left(1 - \frac{\text{Volumen}_{\text{ipsilateral}} - \text{Volumen}_{\text{kontralateral}}}{\text{Volumen}_{\text{kontralateral}}} \right)$$

3.7 *In-vitro*-Rezeptor-Autoradiographie und Analyse der Ligandenbindung

Für die Rezeptor-autoradiographische Analyse der Ligandenbindung an NMDA-, AMPA-, GABA_A- und 5-HT_{1A}-Rezeptoren wurden gefrorene koronare Schnitte auf Höhe des Striatums und des dorsalen Hippocampus gesammelt und quantitative Rezeptor-Autoradiographien mit [³H]MK-801, [³H]AMPA, [³H]Muscimol (Perkin Elmer Inc, Waltham, MA, USA) und [³H]8-OH-DPAT (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA) durchgeführt (Diederich et al., 2012, Frauenknecht et al., 2013, Zilles et al., 2004).

Um endogene Liganden zu entfernen, wurden die Schnitte zunächst mehrmals mit Pufferlösungen gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in der Hauptinkubation mit dem jeweiligen Tritiummarkierten Liganden sowie – um das Ausmaß der unspezifischen Ligandenbindungsdichte zu erfassen – alternierend bei gleichen Bedingungen wie bei der Hauptinkubation auch mit dem jeweiligen unmarkierten Kompetitor im Überschuss inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte wiederum mit der Pufferlösung gewaschen, fixiert (nur im Falle der AMPA-Autoradiographien) sowie luftgetrocknet. Die einzelnen Schritte für die jeweiligen Rezeptoren sind im Folgenden dargestellt.

Um die Ligandenbindungsdichte an AMPA-Rezeptoren zu visualisieren, wurden die Schnitte zunächst bei 4° C drei Mal zehn Minuten in der Pufferlösung (50 mmol Tris-Acetatpuffer, pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 45 Minuten lang bei 4° C mit 10 nmol [³H]AMPA in 50 mmol Tris-Acetat (pH 7,2) mit 100 mM KSCN inkubiert. Alternierende Schnitte wurden mit 5 - 10 mol des Kompetitors Quisqualat in 50 mmol Tris-Acetat (pH 7,2) inkubiert. Die spezifische Aktivität des Liganden [³H]AMPA lag bei 45,5 Ci/mmol. Bei ebenfalls 4° C wurden die Schnitte drei Mal jeweils vier Sekunden mit dem Puffer gewaschen, dann zwei Mal zwei Sekunden lang mit Aceton und Glutaraldehyd im Verhältnis 100 : 2,5 fixiert und abschließend vorsichtig ein bis zwei Sekunden mit heißer und kalter Luft getrocknet.

Um die Ligandenbindung an NMDA-Rezeptoren darzustellen wurden die Schnitte zunächst bei 4° C 15 Minuten lang mit der Pufferlösung aus 30 µmol Glutamat in 50 mmol Tris-HCl (pH 7,2) gewaschen. Zur Darstellung der maximalen Ligandenbindungsdichte wurden die Schnitte 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer magnesium- und zinkfreien Lösung (50 mmol Tris-HCl, pH 7,2) mit 30 µmol Glycin, 50 µmol Spermidin, 50 µmol Glutamat mit 5 nmol [³H]MK801 (spezifische Aktivität 20,0 Ci/mmol) inkubiert. Alternierende Schnitte wurden mit 100 µmol des Kompetitors Mk-801 in 30 mL Hauptinkubationslösung inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte zwei Mal fünf Minuten lang in

der Pufferlösung aus 30 μmol Glutamat in 50 mmol Tris-HCL (pH 7,2) gewaschen, einmal in Aqua purificata gewaschen und vorsichtig mit kalter Luft getrocknet.

Für die Darstellung der Ligandenbindungsdichte an GABA_A-Rezeptoren wurden die Schnitte zunächst bei 4° C drei Mal fünf Minuten in einer Pufferlösung aus 50 mmol Tris-Citrat gewaschen (pH 7,0) und anschließend 40 Minuten bei 4° C mit 4 nmol [³H]Muscimol (spezifische Aktivität 22,0 Ci/mmol) inkubiert. Alternierende Schnitte wurden mit 10 mmol des Kompetitors GABA in 50 mmol der Tris-Citrat (pH 7,0) inkubiert. Die Inkubation wurde durch dreimaliges Spülen mit 4° C kaltem Tris-Citratpuffer für jeweils drei Minuten beendet. Abschließend wurden die Schnitte mit kalter Luft getrocknet.

Die Ligandenbindungsdichte an Serotonin-_{1A}-Rezeptoren wurde quantifiziert, indem die Schnitte 30 Minuten bei 22° C mit 4 mmol CaCl₂ und 0,01 % Ascorbat in 170 mmol Tris-HCL (pH 7,6) gewaschen wurden. Anschließend wurden die Schnitte 60 Minuten 22° C in 170 mmol Tris-HCL (pH 7,6) mit 4 mmol CaCl₂, 0,01 % Ascorbat, 1 nmol [³H]8-OH-DPAT (spezifische Aktivität 120-200 Ci/mmol) inkubiert. Alternierende Schnitte wurden mit 100 μmol des Kompetitors Serotonin in 30 mL der Hauptinkubationslösung inkubiert. Danach wurden die Schnitte fünf Minuten bei 4° C in einer Lösung aus 4 mmol CaCl₂ und 0,01 % Ascorbat in 170 mmol Tris-HCL (pH 7,6) sowie dreimal mit Aqua purificata gewaschen und mit kalter Luft getrocknet.

Für die von Tritium ausgesandte niederenergetische β -Strahlung sensitive Filme (BioMax MR-1 film, Carestream® Kodak®, Rochester, New York, USA) wurden mit den Schnitten sowie mit Tritium-markierten Plastik Standards (Microscales®; Amersham, Freiburg) für 12 Wochen exponiert.

Die Filme wurden anschließend unter konstanten Lichtbedingungen mit einer Kamera aufgenommen und digitalisiert (Roper Scientific, Photometrics CoolSNAP™, Ottobrunn/München) und mit MCID Basic Version 7.0 (MCID Image Analysis Software Solutions for Life Sciences, Imaging Research Inc., St. Catharines, Ontario, Kanada) analysiert. Mittels der mitexponierten Standards wurde das Verhältnis von Grauwerten und Radioaktivität bestimmt in Bezug zu den Kontrollwerten als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben (Diederich et al., 2012).

An Hand des Atlas „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“ (Paxinos und Franklin, 2001) wurden aus dem Peri-Infarkt-Gebiet, aus dem an den Infarkt angrenzenden Kortex (*adjacent cortex*), aus dem Infarktkern (*ischemic core*) sowie in den Hippocampi Areale (Bereiche von Interesse, *Regions of Interest*) definiert, in welchen die Ligandenbindungsdichte analysiert wurde.

In der Peri-Infarkt-Region wurden die unmittelbare Grenzzone (*immediate border zone*) und die Grenzzone (*border zone*) untersucht (vergleiche Abbildung 9). Diese Areale wurden auf die kontralaterale Hemisphäre gespiegelt, wobei die Kortexgrenzen angepasst wurden. Der an den Infarkt angrenzende Kortex wurde ebenfalls sowohl auf der infarzierten Hemisphäre als auch auf der

kontralateralen Hemisphäre untersucht, indem das ipsilaterale Areal auf die kontralaterale Hemisphäre gespiegelt wurde. Dabei wurden ebenfalls die Kortexgrenzen angepasst.

Im Infarktkern wurden die Schichten 1 bis 6 des sekundären somatosensorischen Kortex und die Schichten 1-3 des piriformen Kortex untersucht (vergleiche 2.3.1), sofern sie in der Silberfärbung als ischämisch identifiziert wurden. Für die Schnitte, in denen diese Kortexareale infarziert waren, wurden die jeweiligen Areale auch auf der kontralateralen Hemisphäre analysiert. Die sekundären somatosensorischen Kortices wurden auf Höhe des Striatums (interaural ca. Bregma 5 mm) und auf Höhe des Hippocampus (interaural ca. Bregma 2 mm) untersucht, die piriformen Kortices nur auf Höhe des Striatums.

In den Hippocampi wurden im Cornu ammonis 1 (CA1) die Strata orientale, pyramidale und radiatum untersucht. Im Cornu ammonis 3 (CA3) wurde die Ligandenbindung im Stratum orientale, im Stratum pyramidale gemeinsam mit dem Stratum lucidum sowie im Stratum radiatum analysiert. Im Gyrus dentatus (DG) wurden die Molekular- und Körnerzellschicht (*molecular layer of the dentate gyrus*; Mol und *granular layer of the dentate gyrus*; GrDG) untersucht (vergleiche 2.3.1). Diese Bereiche wurden bei allen Tieren sowohl auf der infarzierten als auch auf der kontralateralen Seite analysiert.

Abbildungen 9 und 10 geben einen Überblick über die untersuchten Hirnareale.

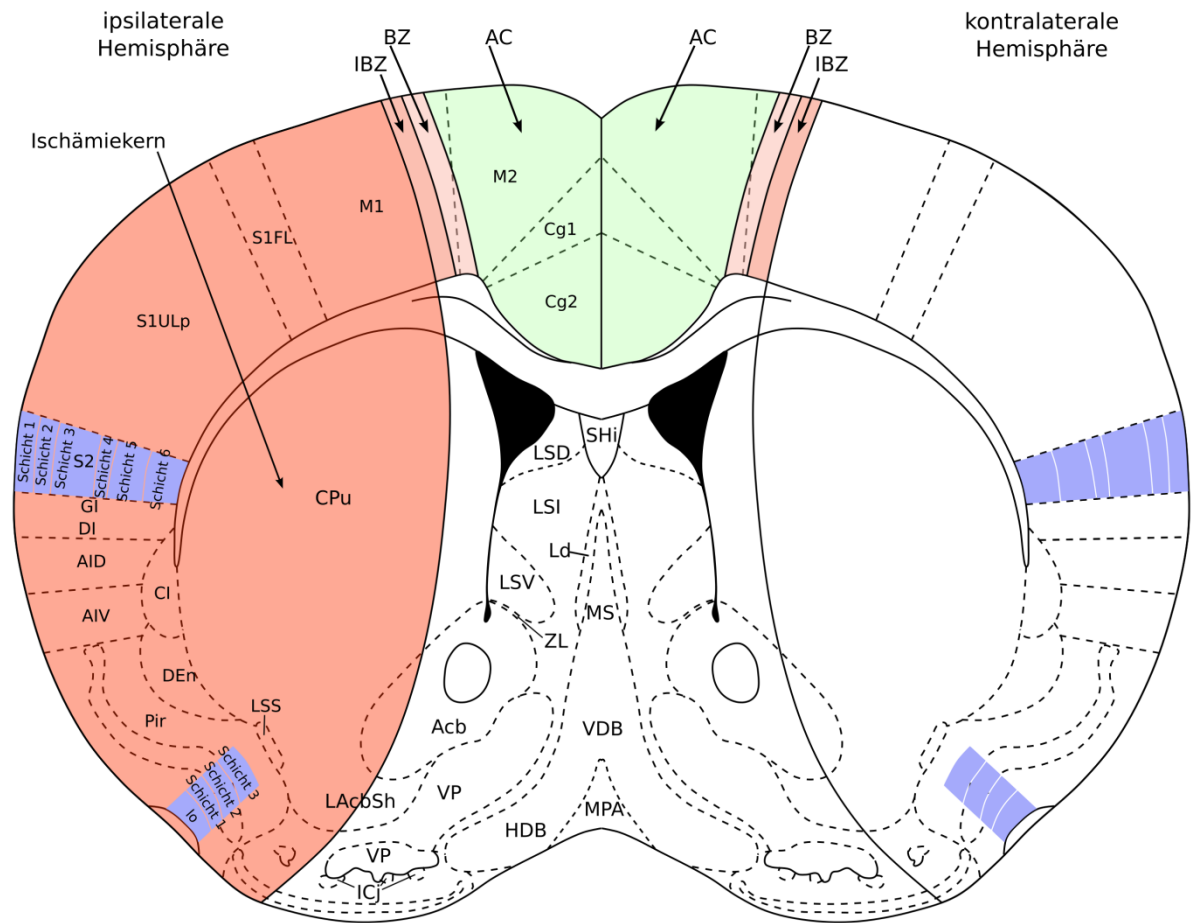


Abbildung 9: Untersuchte Hirnareale auf Höhe des Striatums (interaural 5 mm). In Rot: der Infarktkern, in Hellrot: die unmittelbare Grenzzone (*immediate border zone*; IBZ) und die Grenzzone (*border zone*; BZ). In Grün: das dem Infarkt benachbarte Kortexareal (*adjacent cortex*; AC). In Blau: Kortexareale im Infarktkern: Schichten 1-6 des sekundären somatosensorischen Kortex (S2) und Schichten 1-3 des piriformen Kortex (Pir) sowie der laterale olfaktorische Trakt (Io). Modifiziert mit Genehmigung nach Paxinos und Franklin (1997).

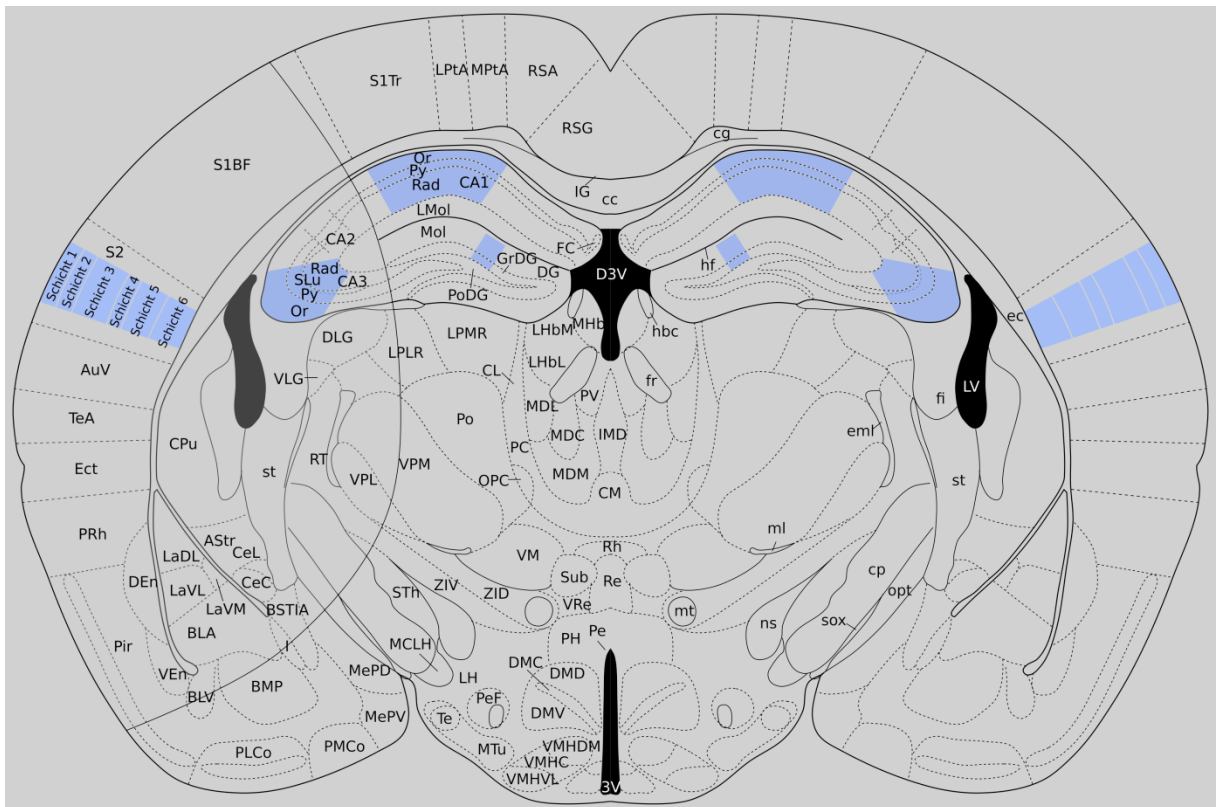


Abbildung 10: Untersuchte Hirnareale auf Höhe des Hippocampus (interaural 2 mm). In Blau: analysierte Kortextareale im Infarkt kern: Schichten 1-6 des sekundären somatosensorischen Kortex (S2) sowie im Hippocampus. Im Cornu ammonis 1 (CA1) wurden die Strata orientale, pyramidale und radiale untersucht, im CA3 wurde die Ligandenbindung im Stratum orientale, im Stratum pyramidale gemeinsam mit dem Stratum lucidum sowie im Stratum radiale analysiert. Im Gyrus dentatus (DG) wurden die molekulare (Mol) und die granulare Schicht (GrDG) untersucht. Modifiziert mit Genehmigung nach Paxinos und Franklin (1997).

Die beschriebenen Bereiche wurden am Bildschirm markiert und die Grauwerte in MCID quantifiziert. Da die Werte der unspezifischen Ligandenbindungsichte nur leicht über der Hintergrundbindung lagen oder überhaupt nicht darstellbar waren, wurde die Hintergrunddichte als unspezifische Ligandenbindungsichte angenommen. Die spezifische optische Dichte wurde bestimmt, indem von der gesamten Ligandenbindungsichte die unspezifische Ligandenbindungsichte subtrahiert wurde. Alle optischen Dichtewerte sind in Prozent relativ zur Wildtypgruppe als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes angegeben.

Abbildung 11 zeigt beispielhaft zwei farbkodierte [^3H]MK-801-Rezeptorautoradiographien.

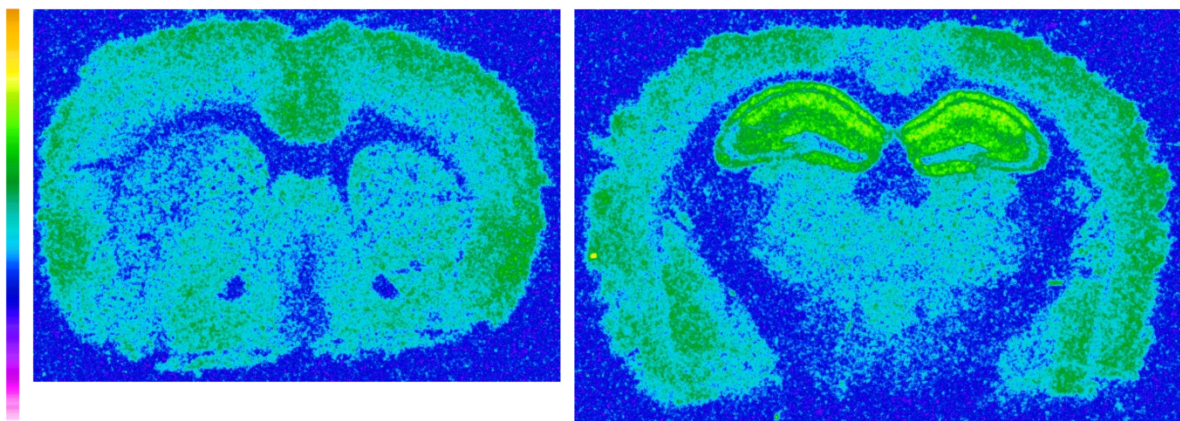


Abbildung 11: Farbkodierte [³H]MK-801-Rezeptor-Autoradiographien eines unbehandelten G-CSF-defizienten Tieres auf Höhe des Striatums (interaural ca. 5 mm) und des Hippocampus (interaural ca. 2 mm).

3.8 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde Microsoft Excel 2003 mit Analyse-it Version 2.22 (Analyse-it Software Ltd., Leeds, Vereinigtes Königreich) verwendet.

Statistische Vergleiche zwischen den drei Gruppen wurden mit Hilfe von *one-way analysis of variance* bei normaler Verteilung der Messwerte und mit Hilfe von Kruskal-Wallis-Tests bei nicht normal verteilten Messwerten durchgeführt. Die Normalverteilung wurde mit dem F-Test überprüft. Sofern ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vorlag, folgte für das jeweilige Areal eine *post-hoc*-Analyse zwischen den drei Gruppen untereinander mittels t-Test bei Normalverteilung der Messwerte und mit Mann-Whitney-Tests bei nicht normaler Verteilung der Messwerte.

Bei *one-way analysis of variance*-Tests wurde eine Bonferroni-Fehlerkorrektur mit einem Konfidenzintervall von 95% verwendet.

Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant gewertet bei p-Werten < 0,05 sowie bei p-Werten < $\frac{0,05}{3} = 0,017$ für die *post-hoc*-Analysen. Die Ligandenbindungsdichten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes in % relativ zur Wildtypgruppe angegeben, wobei der Mittelwert der Wildtypgruppe 100% entspricht.

Unterschiede in den Infarkt volumina wurden mittels *one-way analysis of variance* untersucht, wobei eine Bonferroni-Fehlerkorrektur verwendet wurde.

Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant gewertet bei p-Werten < 0,05 und Infarkt volumina sind als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes in mm³ angegeben.

4. Ergebnisse

Teile dieser Promotionsarbeit wurden vorab publiziert (Mammele et al., 2015).

4.1 Mortalitätsraten

Neun von insgesamt 52 Mäusen starben innerhalb von 24 Stunden nach zerebraler Reperfusion. Die Mortalitätsrate lag für Wildtyp-Tiere bei 17.4 % (4 von 23 Tieren), für unbehandelte G-CSF-defiziente Tiere bei 17.6 % (3 von 17 Tieren) und in der Substitutionsgruppe bei 16.7 % (2 von 12 Tieren).

4.2 Infarktvolumina

24 Stunden nach 45-minütiger Okklusion der Arteria cerebri media waren zwischen den drei Gruppen in Bezug auf die Infarktvolumina keine signifikanten Unterschiede vorhanden (Abbildung 12).

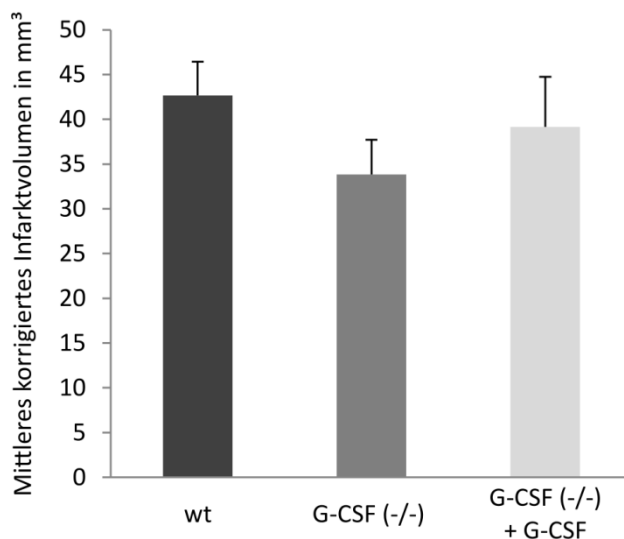


Abbildung 12: Mittlere korrigierte Infarktvolumina 24 Stunden nach 45-minütiger Ischämie. Werte in mm³ (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes). Zwischen den drei Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

4.3 Ligandenbindungsdichten

4.3.1 Ligandenbindungsdichten von [³H]AMPA an AMPA-Rezeptoren

In den Ligandenbindungsdichten von [³H]AMPA waren im Vergleich zu den anderen Liganden die größten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Unterschiede bestanden zwischen Wildtyp-Tieren und nicht substituierten Tieren sowie zwischen der Substitutionsgruppe und unbehandelten Tieren.

Im Infarktkern war die Ligandenbindungsdichte in allen Gruppen niedriger als in korrespondierenden intakten Arealen in der kontralateralen Hemisphäre (nicht gezeigt).

In der Peri-Infarkt-Region auf Höhe des Striatums war die Ligandenbindungsichte an AMPA-Rezeptoren in der nicht substituierten Gruppe, verglichen mit der Wildtyp- und Substitutionsgruppe, deutlich erhöht. Die Erhöhung der Ligandenbindungsichte in den nicht substituierten Tieren war in Arealen in räumlicher Nähe zum Infarktkern am größten. In den auf die kontralaterale Hemisphäre gespiegelten korrespondierenden Arealen zeigte sich bei nicht substituierten G-CSF-defizienten Tieren im Vergleich zur Wildtypgruppe ebenfalls eine erhöhte Ligandenbindungsichte. Dieser Unterschied erreichte kontralateral korrespondierend zu dem an den Infarkt angrenzenden Kortexareal statistische Signifikanz (Abbildung 13).

In den untersuchten Hippocampus-Arealen der ipsilateralen Hemisphäre war die Ligandenbindungsichte, verglichen mit der Wildtypgruppe, in der nicht substituierten Gruppe ebenfalls erhöht, wobei G-CSF-Substitution diesen Effekt weitgehend nivellierte. In den kontralateralen Hippocampus-Arealen waren die Ligandenbindungsichten in den drei untersuchten Gruppen einander ähnlich (Abbildung 13).

Im sekundären somatosensorischen Kortex im Infarktkern auf striataler Höhe war die Ligandenbindungsichte von [³H]AMPA sowohl in der nicht substituierten als auch in der substituierten Gruppe besonders in tieferen Schichten erniedrigt. Konträr dazu war in nicht substituierten Tieren im kontralateralen sekundären somatosensorischen Kortex in der nicht substituierten Gruppe, verglichen mit der Wildtypgruppe eine deutlich erhöhte Ligandenbindungsichte an AMPA-Rezeptoren zu verzeichnen. Signifikant wurde dieser Unterschied in den Schichten 5 und 6. G-CSF-Substitution nivellierte diesen Effekt wiederum weitgehend (Abbildung 14).

Analog zum sekundären somatosensorischen Kortex auf der kontralateralen Hemisphäre war die Ligandenbindungsichte an AMPA-Rezeptoren im kontralateralen piriformen Kortex auf Höhe des Striatums im Vergleich zur Kontrolle stark erhöht. Dieser Unterschied war in allen Schichten des piriformen Kortex sowie im lateralen olfaktorischen Kortex statistisch signifikant. Wie im kontralateralen sekundären somatosensorischen Kortex entsprachen die Ligandenbindungsichten in substituierten Tieren in den Schichten des piriformen Kortex weitgehend denen der Wildtypgruppe (Abbildung 14).

Im sekundären somatosensorischen Kortex auf Höhe des Hippocampus war die Ligandenbindungsichte im Infarktkern in nicht substituierten Tieren, verglichen mit der Wildtypgruppe, stark erhöht. Durch G-CSF-Substitution wurde dieser Effekt wiederum weitgehend nivelliert. Im kontralateralen sekundären somatosensorischen Kortex waren die Ligandenbindungsichten einander in den drei Gruppen ähnlich (Abbildung 14).

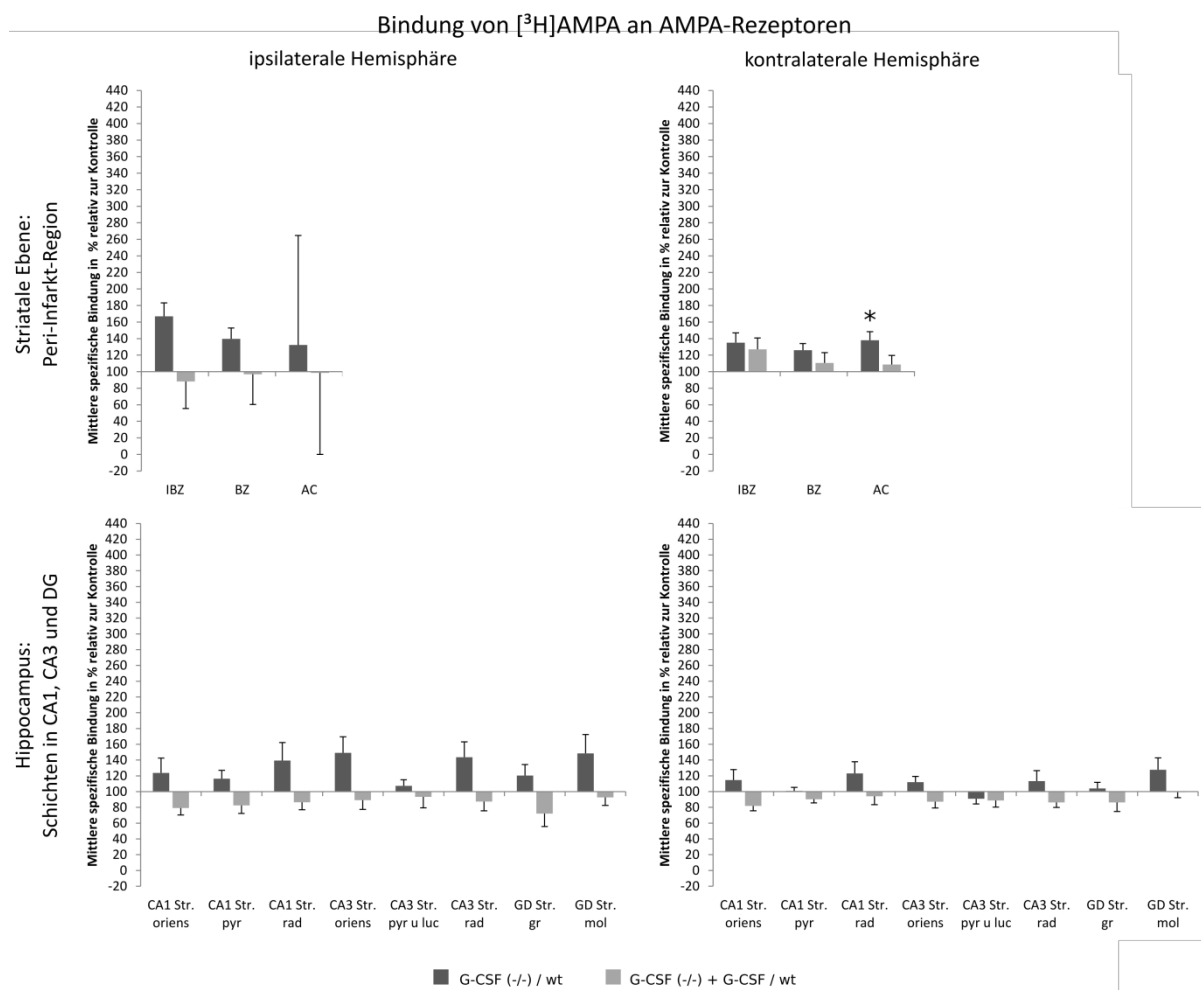


Abbildung 13: Ligandenbindungsichten von [³H]AMPA an AMPA-Rezeptoren in der Peri-Infarkt-Region und in ausgewählten Hippocampus-Arealen auf der Seite des Infarktes und kontralateral. Werte in % relativ zur Wildtypgruppe (Mittelwert der Wildtypgruppe entspricht 100%; Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes, * $p < \frac{0,05}{3} = 0,017$).

IBZ: *immediate border zone*, unmittelbare Grenzzone; BZ: *border zone*, Grenzzone; AC: *adjacent cortex*, dem Infarkt angrenzender Kortex; Str. oriens: Stratum oriens; Str. pyr: Stratum pyramidale; Str. rad: Stratum radiatum; Str. pyr u luc: Stratum pyramidale und Stratum lucidum; Str. gr: Stratum granulosum; Str. mol: Stratum moleculare; GD: Gyrus dentatus.

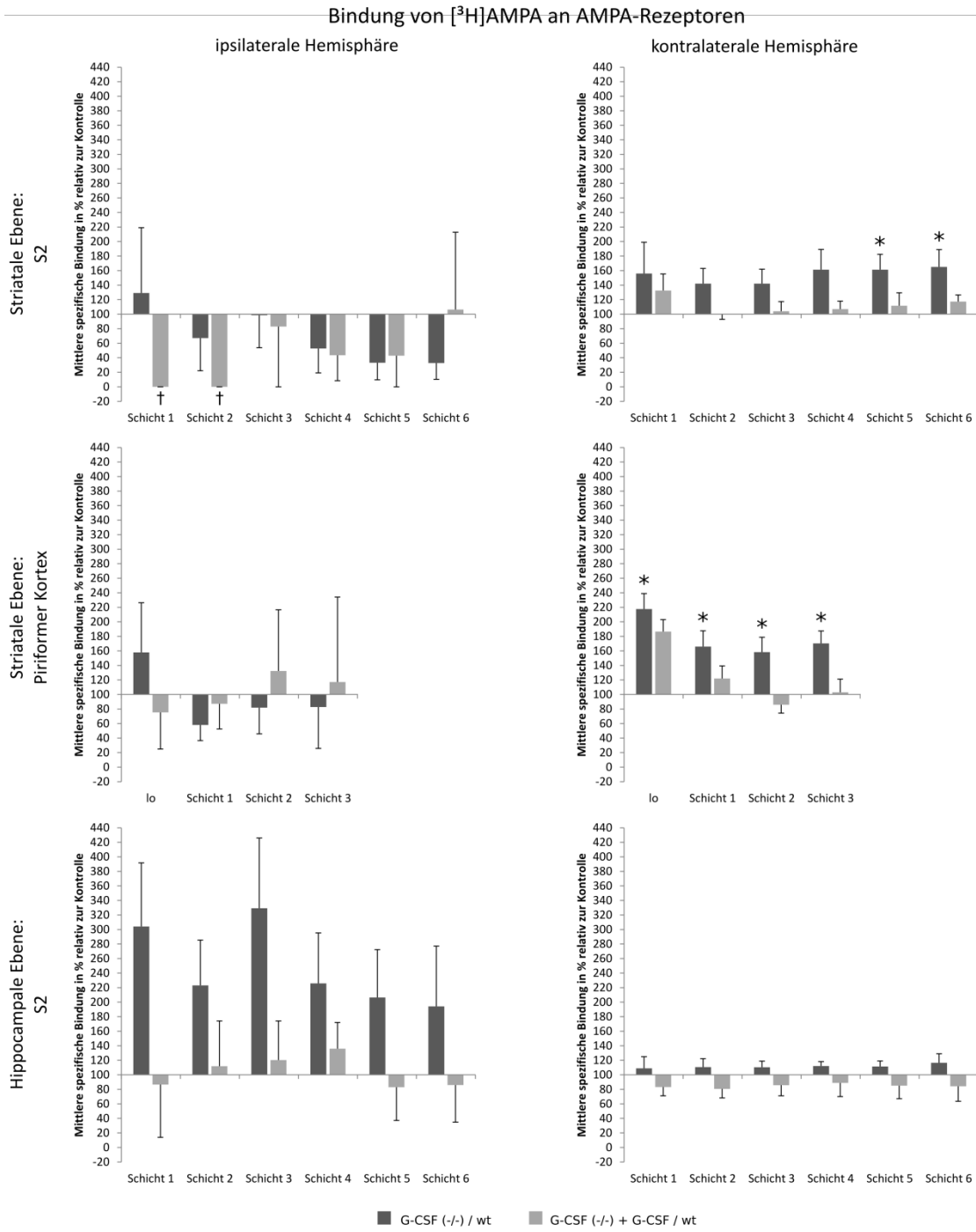


Abbildung 14: Ligandenbindungsichten von [³H]AMPA an AMPA-Rezeptoren in Kortex arealen im Infarktkern und kontralateral des Infarktes: Sekundärer somatosensorischer Kortex auf Höhe des Striatums und des Hippocampus sowie piriformer Kortex auf Höhe des Striatums. Werte in % relativ zur Wildtypgruppe (Mittelwert der Wildtypgruppe entspricht 100%; Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwertes, * $p < \frac{0,05}{3} = 0,017$). † Die Ligandenbindungsichte von [³H]AMPA war in Schicht 1 und 2 in allen Tieren der Substitutionsgruppe null.

S2: sekundärer somatosensorischer Kortex; lo: lateraler olfaktorischer Trakt.

4.3.2 Ligandenbindungsichten von [³H]MK801 an NMDA-Rezeptoren

Zwischen den drei untersuchten Gruppen waren in den Ligandenbindungsichten von [³H]MK801 kaum Unterschiede vorhanden.

Im Infarktkern waren die Ligandenbindungsichte an NMDA-Rezeptoren in allen Gruppen niedriger als in den korrespondierenden Arealen in der kontralateralen Hemisphäre (nicht gezeigt).

In der Peri-Infarkt-Region waren keine Unterschiede in der Ligandenbindungsichte an NMDA-Rezeptoren erkennbar (Abbildung 15).

Im kontralateralen Hippocampus im Stratum pyramidale des CA1 Sektors war die Ligandenbindungsichte an NMDA-Rezeptoren in nicht substituierten G-CSF-defizienten Tieren, im Vergleich zur Wildtypgruppe signifikant erniedrigt. Mit G-CSF substituierte Tiere zeigten Ligandenbindungsichten, die der Wildtypgruppe entsprachen (Abbildung 15).

Im sekundären somatosensorischen Kortex im Infarktkern auf Höhe des Striatums war die Ligandenbindungsichte in der Substitutionsgruppe, im Vergleich zur Kontrolle besonders in Schicht 2 bis 5 tendenziell niedriger. Dieser Effekt war bei den nicht substituierten G-CSF-defizienten Tieren nicht feststellbar; hier entsprachen die Ligandenbindungsichten größtenteils denen der Wildtyp-Tiere (Abbildung 16).

Auffällig war eine deutlich, jedoch nicht signifikante, Erhöhung der MK-801-Ligandenbindungsichte in Schicht 1 des piriformen Kortex ipsilateral (Abbildung 16).

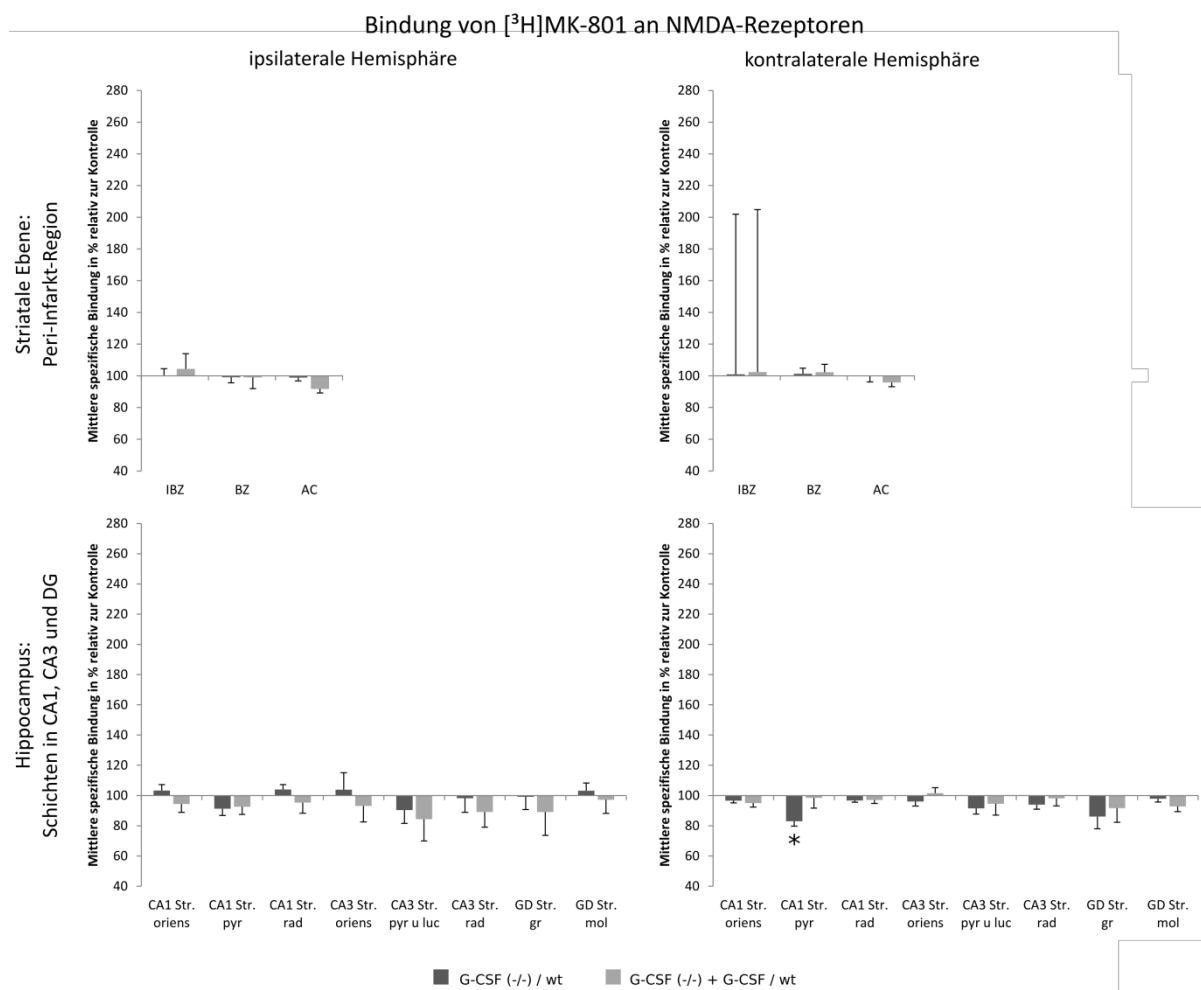


Abbildung 15: Ligandenbindungsichten von [³H]MK801 an NMDA-Rezeptoren in der Peri-Infarkt-Region und in ausgewählten Hippocampus-Arealen auf der Seite des Infarktes und kontralateral. Werte in % relativ zur Wildtypgruppe (Mittelwert der Wildtypgruppe entspricht 100%; Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes, * $p < \frac{0,05}{3} = 0,017$).

IBZ: *immediate border zone*, unmittelbare Grenzzone; BZ: *border zone*, Grenzzone; AC: *adjacent cortex*, dem Infarkt angrenzender Kortex; Str. oriens: Stratum oriens; Str. pyr: Stratum pyramidale; Str. rad: Stratum radiatum; Str. luc: Stratum lucidum; Str. gr: Stratum granulosum; Str. mol: Stratum moleculare; GD: Gyrus dentatus.

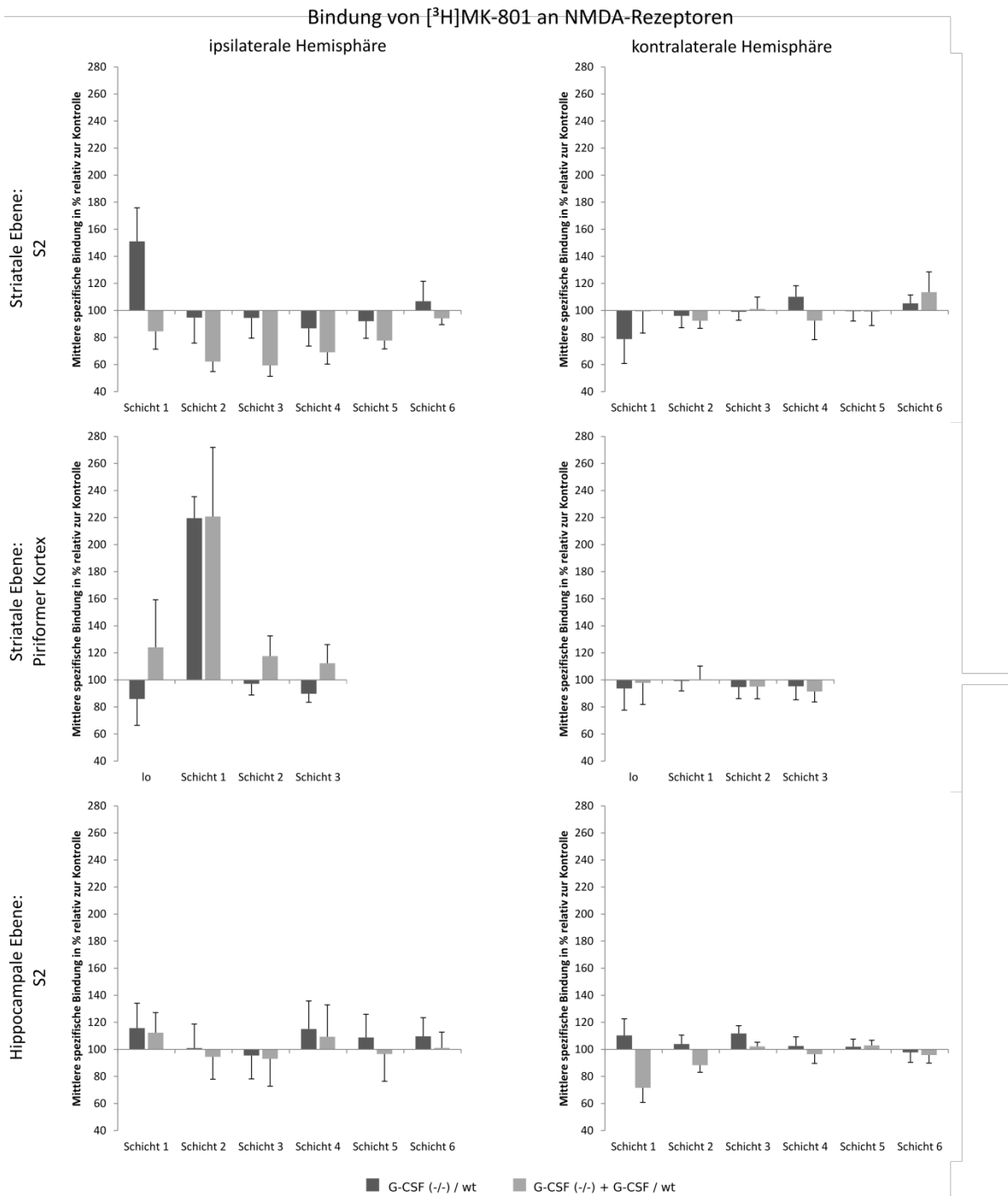


Abbildung 16: Ligandenbindungsichten von [³H]MK801 an NMDA-Rezeptoren in Kortex-arealen im Infarktkern und kontralateral des Infarktes: Sekundärer somatosensorischer Kortex auf Höhe des Striatums und des Hippocampus sowie piriformer Kortex auf Höhe des Striatums. Werte in % relativ zur Wildtypgruppe (Mittelwert der Wildtypgruppe entspricht 100%; Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes, * $p < \frac{0,05}{3} = 0,017$).

S2: sekundärer somatosensorischer Kortex; lo: lateraler olfaktorischer Trakt.

4.3.3 Ligandenbindungsdichten von [³H]Muscimol an GABA_A-Rezeptoren

In den drei untersuchten Gruppen waren nur geringe Unterschiede in den Ligandenbindungsdichten von [³H]Muscimol vorhanden.

In den ischämischen Arealen waren die Ligandenbindungsdichten von [³H]Muscimol in allen Gruppen erhöht (nicht gezeigt). Ansonsten ergaben sich für die jeweiligen experimentellen Gruppen wenige, statistisch nicht signifikante Trends.

In der Peri-Infarkt-Region waren die Ligandenbindungsdichten in den drei Gruppen weitgehend gleich. In dem der unmittelbaren Grenzzone korrespondierenden Areal auf der kontralateralen Hemisphäre war die Ligandenbindungsdichte an GABA_A-Rezeptoren in der Substitutionsgruppe deutlich vermindert, allerdings statistisch nicht signifikant (Abbildung 17).

Auch in den ipsi- und kontralateralen Hippocampus-Arealen fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abbildung 17).

Im sekundären somatosensorischen Kortex auf Höhe des Striatums waren die Ligandenbindungsdichten von [³H]Muscimol der drei Gruppen weitgehend gleich (Abbildung 18).

Im ipsilateralen piriformen Kortex und im lateralen olfaktorischen Trakt im Infarktkern auf Höhe des Striatums zeigte sich eine deutliche Verminderung der Ligandenbindungsdichte von [³H]Muscimol an GABA_A-Rezeptoren in der Substitutionsgruppe. Dieser Effekt war statistisch jedoch nicht signifikant. Die nicht substituierten Tiere zeigten Ligandenbindungsdichten ähnlich der Wildtypgruppe (Abbildung 18).

Die Ligandenbindungsdichten von [³H]Muscimol im sekundären somatosensorischen Kortex auf Höhe des Hippocampus waren bei substituierten Tieren tendenziell höher als in Wildtyp-Tieren und in nicht substituierten Tieren (Abbildung 18).

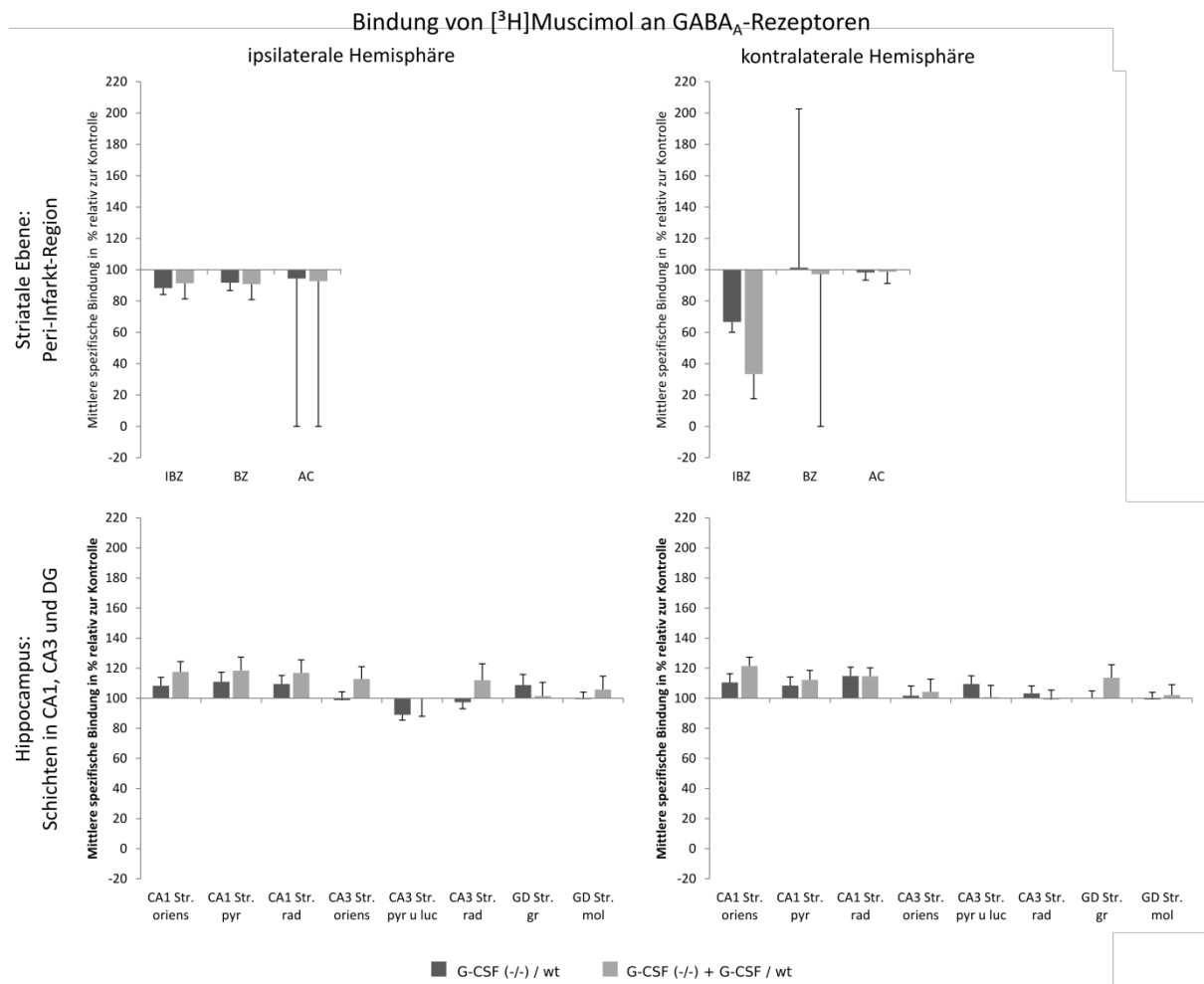


Abbildung 17: Ligandenbindungsichten von [³H]Muscimol an GABA_A-Rezeptoren in der Peri-Infarkt-Region und in ausgewählten Hippocampus-Arealen auf der Seite des Infarktes und kontralateral. Werte in % relativ zur Wildtypgruppe (Mittelwert der Wildtypgruppe entspricht 100%; Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwertes, * $p < \frac{0,05}{3} = 0,017$).

IBZ: *immediate border zone*, unmittelbare Grenzzone; BZ: *border zone*, Grenzzone; AC: *adjacent cortex*, dem Infarkt angrenzender Kortex; Str. oriens: Stratum oriens; Str. pyr: Stratum pyramidale; Str. rad: Stratum radiatum; Str. luc: Stratum lucidum; Str. gr: Stratum granulosum; Str. mol: Stratum moleculare; GD: Gyrus dentatus.

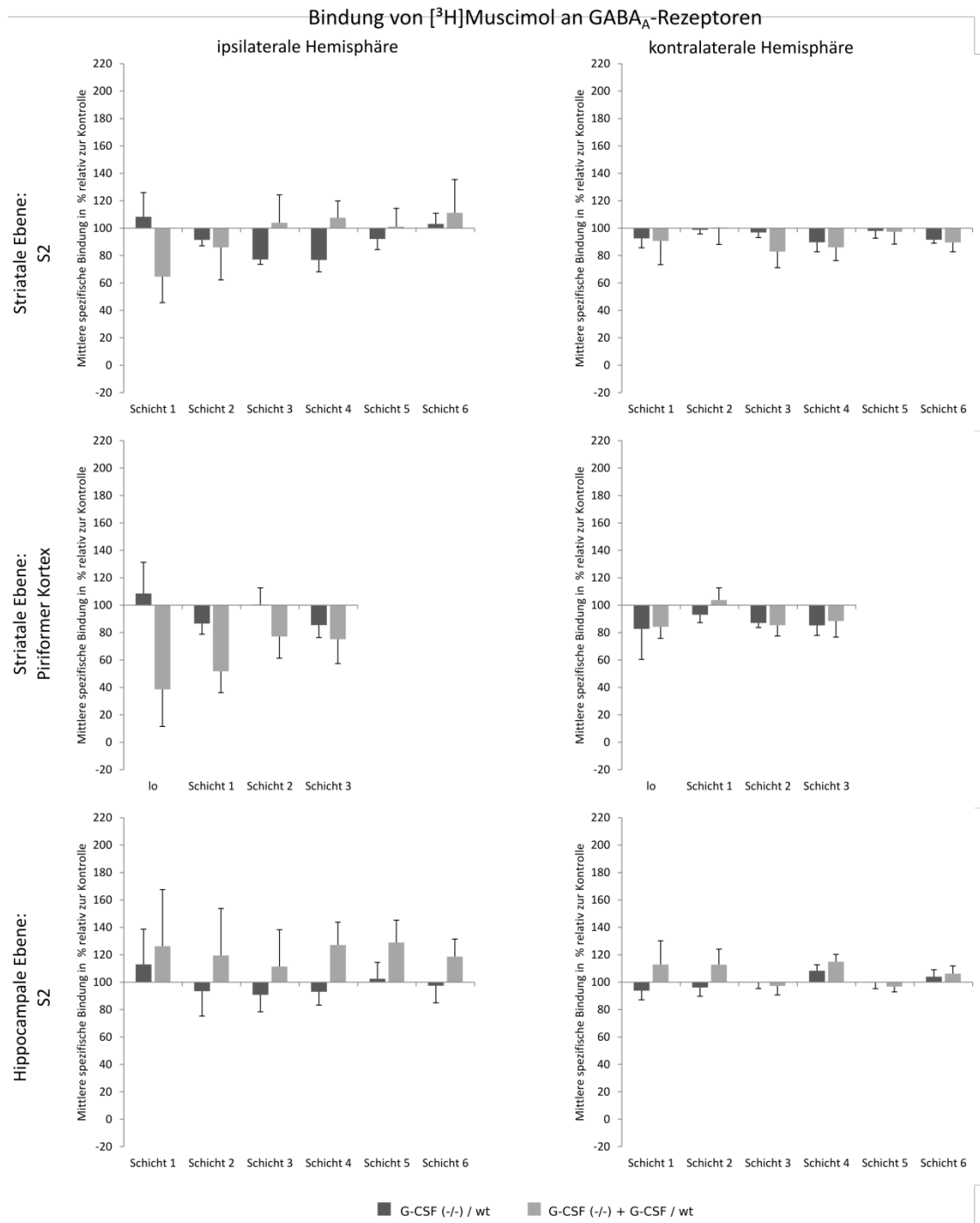


Abbildung 18: Ligandenbindungsichten von [³H]Muscimol an GABA_A-Rezeptoren in Kortexarealen im Infarktkern und kontralateral des Infarktes: sekundärer somatosensorischer Kortex auf Höhe des Striatums und des Hippocampus sowie piriformer Kortex auf Höhe des Striatums. Werte in % relativ zur Wildtypgruppe (Mittelwert der Wildtypgruppe entspricht 100%; Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwertes, *p < $\frac{0,05}{3} = 0,017$).

S2: sekundärer somatosensorischer Kortex; lo: lateraler olfaktorischer Trakt.

4.3.4 Ligandenbindungsdichten von [³H]8-OH-DPAT an 5-HT_{1A}-Rezeptoren

In den Ligandenbindungsdichten von [³H]8-OH-DPAT fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Lediglich kleine Trends waren vorhanden.

In den ischämischen Arealen waren die Ligandenbindungsdichten von [³H]8-OH-DPAT in allen Gruppen niedriger als in den korrespondierenden kontralateralen Bereichen (nicht gezeigt).

In der Peri-Infarkt-Region und in den entsprechenden kontralateralen Bereichen waren keine Unterschiede erkennbar (Abbildung 19).

Im CA3-Sektor des Hippocampus zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung der Ligandenbindungsdichte an 5-HT_{1A}-Rezeptoren in der Substitutionsgruppe verglichen mit der Wildtypgruppe und nicht substituierten Tieren. In der kontralateralen Hemisphäre waren keine nennenswerten Unterschiede in den hippocampalen [³H]8-OH-DPAT-Ligandenbindungsdichten zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen erkennbar (Abbildung 19).

Auch im sekundären somatosensorischen Kortex im Infarktkern sowie im korrespondierenden kontralateralen sekundären somatosensorischen Kortex waren keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar (Abbildung 20).

In den unterschiedlichen Schichten des piriformen Kortex zeigten sich weder ipsi- noch kontralateral Unterschiede zwischen den Gruppen. Im lateralen olfaktorischen Kortex in der ischämischen Hemisphäre war die Ligandenbindungsdichte in der Substitutionsgruppe, im Vergleich zur Wildtypgruppe deutlich vermindert, allerdings war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Nicht substituierte G-CSF-defiziente Tiere zeigten Ligandenbindungsdichten sehr ähnlich denen der Wildtypiere. Im Gegensatz dazu war die Ligandenbindungsdichte im lateralen olfaktorischen Trakt auf der kontralateralen Seite sowohl in substituierten als auch in nicht substituierten Tieren, im Vergleich zur Wildtypgruppe deutlich, jedoch nicht signifikant, erhöht (Abbildung 20).

Im sekundären somatosensorischen Kortex auf Höhe des Hippocampus zeigten sich ipsilateral wie auch kontralateral keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 20).

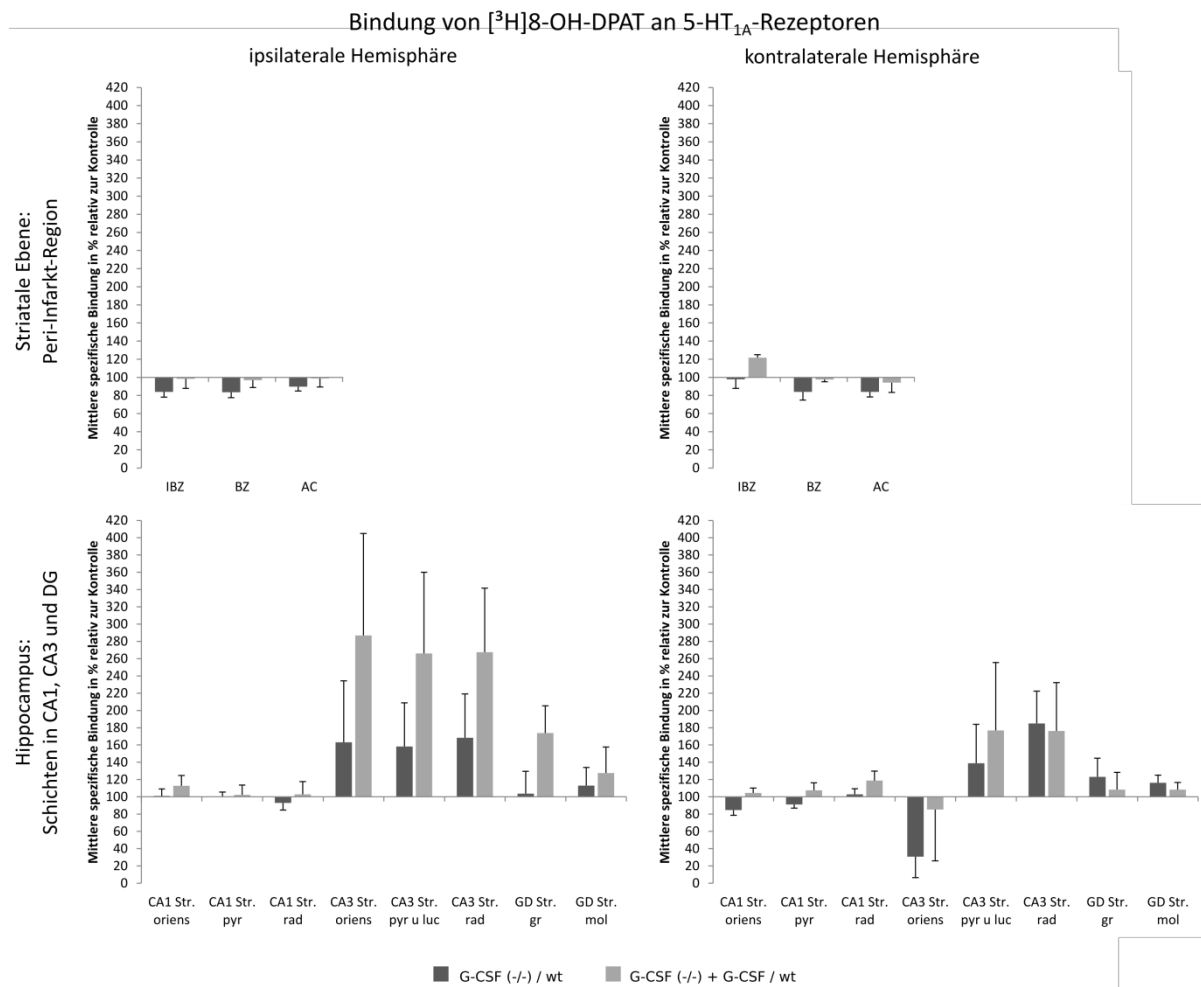


Abbildung 19: Ligandenbindungsichten von [³H]8-OH-DPAT an 5-HT_{1A}-Rezeptoren in der Peri-Infarkt-Region und in ausgewählten Hippocampus-Arealen auf der Seite des Infarktes und kontralateral. Werte in % relativ zur Wildtypgruppe (Mittelwert der Wildtypgruppe entspricht 100%; Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes, * $p < \frac{0,05}{3} = 0,017$).

IBZ: *immediate border zone*, unmittelbare Grenzzone; BZ: *border zone*, Grenzzone; AC: *adjacent cortex*, dem Infarkt angrenzender Kortex; Str. oriens: Stratum oriens; Str. pyr: Stratum pyramidale; Str. rad: Stratum radiatum; Str. luc: Stratum lucidum; Str. gr: Stratum granulosum; Str. mol: Stratum moleculare; GD: Gyrus dentatus.

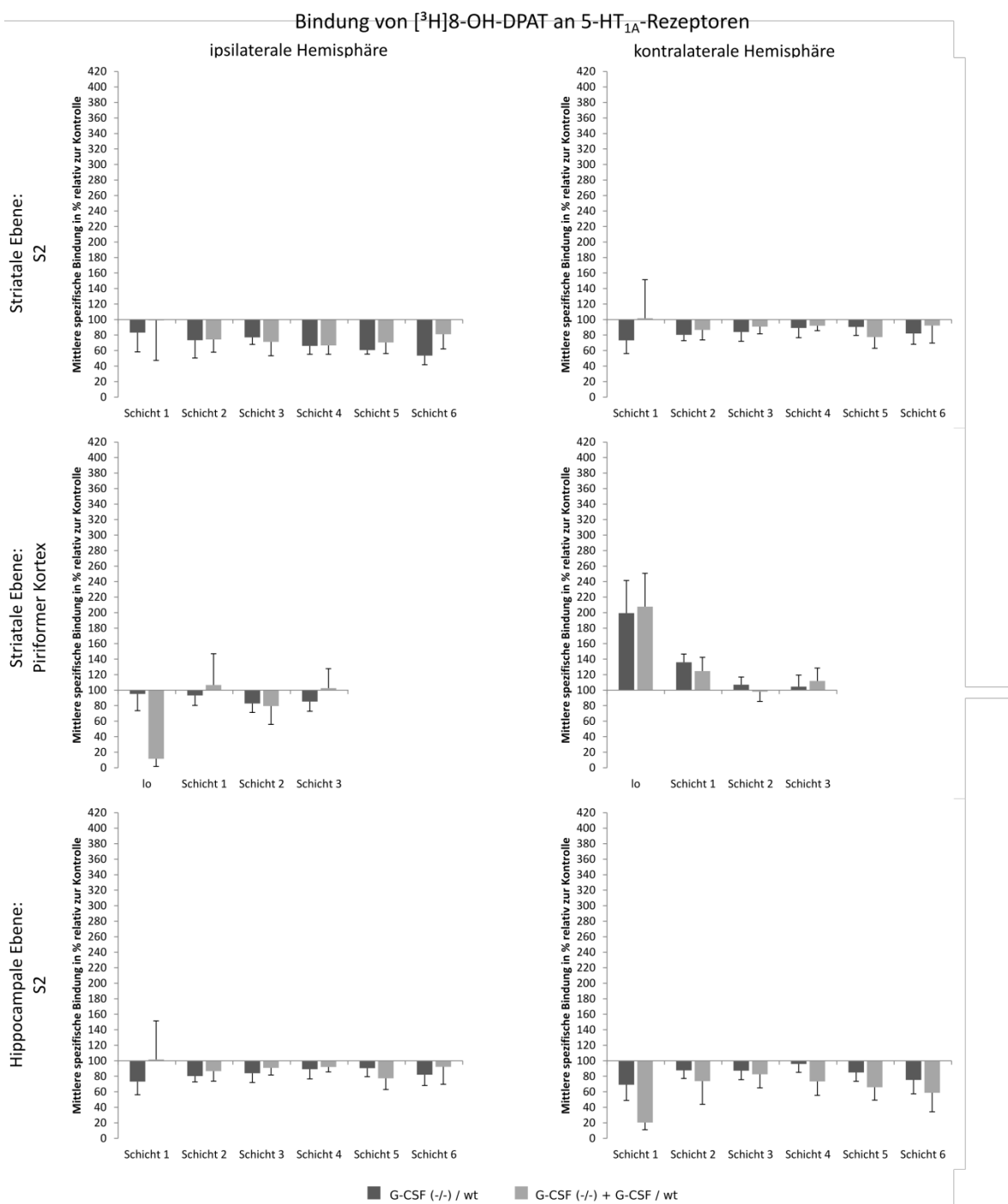


Abbildung 20: Ligandenbindungsichten von [³H]8-OH-DPAT an 5-HT_{1A}-Rezeptoren in Kortexarealen im Infarktkern und kontralateral des Infarktes: Sekundärer somatosensorischer Kortex auf Höhe des Striatums und des Hippocampus sowie piriformer Kortex auf Höhe des Striatums. Werte in % relativ zur Wildtypgruppe (Mittelwert der Wildtypgruppe entspricht 100%; Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwertes, * $p < \frac{0,05}{3} = 0,017$).

S2: sekundärer somatosensorischer Kortex; lo: lateraler olfaktorischer Trakt.

5. Diskussion

In der Vorstudie zu dieser Arbeit konnten neuroprotektive Effekte von G-CSF in einem Mausmodell mit G-CSF-defizienten Tieren demonstriert werden: Transiente fokale zerebrale Ischämie ging bei G-CSF-defizienten Mäusen nach 48 Stunden mit größeren Infarkten und schlechterem neurologischen Outcome einher. Dieser Effekt konnte durch Substitution von G-CSF nivelliert werden (Sevimli et al., 2009).

Die vorliegende Arbeit sollte untersuchen, ob spezifische Unterschiede in den Ligandenbindungsichten an exzitatorischen Glutamat-, inhibitorischen GABA_A- oder modulierenden 5-HT_{1A}-Rezeptoren zwischen den unterschiedlichen experimentellen Gruppen bestehen, die möglicherweise die beschriebenen größeren Infarkte in den G-CSF-defizienten Tieren erklären. Dazu wurden Infarkt volumina sowie die Ligandenbindungsichten an NMDA-, AMPA-, GABA_A- und 5-HT_{1A}-Rezeptoren in ausgewählten Hirnarealen in Wildtyp-Tieren, G-CSF-defizienten Mäusen und G-CSF-defizienten Mäusen, welchen G-CSF substituiert wurde, 24 Stunden nach 45-minütiger fokaler zerebraler Ischämie untersucht.

5.1 Diskussion der Ergebnisse

5.1.1 Infarktvolumina

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, dass 24 Stunden nach 45-minütiger fokaler Ischämie, also im frühen post-ischämischen Zeitraum, die Infarktvolumina zwischen G-CSF-defizienten Mäusen und Wildtyp-Tieren nicht statistisch signifikant unterschiedlich waren. Dies ist ein zunächst überraschendes Ergebnis, insbesondere da das Experimentdesign der vorliegenden Arbeit und der Vorstudie bis auf den späteren Zeitpunkt der Gewebeentnahme bei der Vorstudie weitgehend identisch sind. So zeigten sich in der Vorstudie 48 Stunden nach Ischämie in G-CSF-defizienten Tieren größere Infarkte als in Wildtyp-Tieren. Diese Unterschiede konnten durch G-CSF-Substitution nivelliert werden (Sevimli et al., 2009).

Dieses Ergebnis bestätigt weiterhin, dass es problematisch ist, Infarktvolumina nur zu einem einzigen Zeitpunkt zu bestimmen. Die Bestimmung von Infarktvolumina zu mehreren Zeitpunkten wäre aufschlussreicher, dies würde allerdings eine größere Anzahl an Versuchstieren erfordern (Fisher et al., 2009).

5.1.2 Ligandenbindungsichten an AMPA-, NMDA-, GABA_A- und 5-HT_{1A}-Rezeptoren

Die meisten statistisch signifikanten Unterschiede in den Ligandenbindungsichten waren in den AMPA-Rezeptor-Autoradiographien erkennbar. So zeigte sich in den Arealen um den Infarkt sowie in kontralateralen Kortexarealen eine teilweise statistisch signifikant höhere Ligandenbindungsichte an AMPA-Rezeptoren in G-CSF-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Dieser Effekt scheint

spezifisch auf die Abwesenheit von G-CSF zurückzuführen zu sein, da die Ligandenbindungsichten der Tiere, denen G-CSF substituiert wurde, weitgehend denen der Wildtyp-Tiere entsprachen.

Glutamat ist der wichtigste erregende Ligand im zentralen Nervensystem und wirkt über AMPA, Kainat und NMDA-Rezeptoren. Die Glutamat-Rezeptoren sind an zahllosen neurodegenerativen Prozesse beteiligt, wobei insbesondere AMPA ein hohes exzitotoxisches Potential besitzt und an verzögertem Zelltod in der ischämischen Phase beteiligt ist (Kristensen et al. (2001) und 2.3.3).

Während die Prävention von AMPA-Rezeptor-assoziiierter Exzitotoxizität durch G-CSF im frühen Zeitraum nach zerebraler Ischämie neuroprotektiv wirkt (vergleiche 2.3.3), ist in der chronischen post-ischämischen Phase die Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren eine Voraussetzung für erfolgreiche Regeneration und verbessertes neurologisches Outcome (Carmichael, 2012).

Dieser Aspekt ist von vielen Neuroprotektiva bekannt, welche zwar in der frühen post-ischämischen Phase protektiv wirken, in der Erholungsphase aber negative Auswirkungen haben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die meisten Neuroprotektiva eine biphasische Rolle haben: in der akuten Phase verhindern sie Zellschäden, in der Erholungsphase haben sie jedoch schädigende Auswirkungen. Relevant ist dies auch für die Übertragung von Daten aus Tiermodellen auf Schlaganfallpatienten (vergleiche 5.3.4 und Lo (2008b)).

Die erhöhten Ligandenbindungsichten an AMPA-Rezeptoren in Kortexarealen um den Infarktkern sowie in der kontralateralen Hemisphäre bei G-CSF-defizienten Tieren bieten eine Erklärung für die nach 48 Stunden feststellbaren größeren Infarkt volumina bei G-CSF-defizienten Tieren. Weiterhin scheint die Prävention post-ischämischer AMPA-Rezeptor-Hochregulation, neben den in Abschnitt 2.2.3 besprochenen Mechanismen, ein weiterer, bisher noch nicht beschriebener neuroprotektiver Mechanismus von G-CSF zu sein (Mammele et al., 2015).

5.2 Diskussion von Material und Methoden

5.2.1 Verwendetes Schlaganfallmodell

Für die vorliegende Arbeit wurde ein etabliertes Schlaganfallmodell verwendet: Über 45 Minuten wurde weiblichen, tief anästhesierten Mäusen mittels Monofilament die Arteria cerebri media okkludiert, wobei sowohl die Ischämie als auch die anschließende Reperfusion mittels Laserdoppler validiert wurden (siehe 3.4 und Hata et al. (1998)). Somit wurde eine Methode gewählt, welche reproduzierbar eine fokale, relativ große und monohemisphärische transiente Ischämie hervorruft (Carmichael, 2005). Die Okklusion mittels Monofilament gewährleistet die prompte Reperfusion von ischämischen Arealen. Prompte Reperfusion ist in spontanen cerebralen Ischämien beim Menschen nur bedingt typisch, ahmt jedoch die zukünftig immer häufiger eingesetzte mechanische Thrombektomie nach (Sommer, 2017).

Fokale Ischämien treten bei Menschen weitaus häufiger auf als globale Ischämien, wobei das von der Arteria cerebri media versorgte Hirnareal beim Menschen am häufigsten von ischämischen Insulten betroffen ist (siehe 2.2.5). Durch die Wahl eines fokalen Schlaganfallmodells im Stromgebiet der Arteria cerebri media wurde also der beim Menschen häufigsten Situation Rechnung getragen.

Transiente Ischämien sind für die weitergehende Untersuchung von Neuroprotektiva die empfohlene Modalität, während permanente Ischämien zu Beginn der Untersuchungen angewandt werden sollten (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, 1999, Fisher et al., 2009). Da die vorliegende Untersuchung zu G-CSF zu den weitergehenden Untersuchungen zählt, wurde hier ein Reperusionsmodell gewählt. Weiterhin stellt die Reperfusion einen signifikanten Aspekt ischämischer Schlaganfälle beim Menschen dar (Carmichael, 2005), der durch das gewählte Modell berücksichtigt wird.

Bei einer relativ langen Ischämiedauer von 45 Minuten entsteht reproduzierbar ein recht großes ischämisches Areal, allerdings variieren die Infarktgrößen zwischen und innerhalb verschiedener Mäusespezies relativ stark (Carmichael, 2005). Dieser Aspekt wurde in Anbetracht der niedrigeren Morbidität und Mortalität als hinnehmbar empfunden. Bei einer Zeitdauer von 45 Minuten ist eine schnelle Infarzierung des Striatums und eine verzögerte Infarzierung im Kortex zu beobachten (Hermann et al., 2001), eine Infarktausbreitung, die für diese Studie passend erschien.

Halothan ist, wie viele volatile Narkotika, neuroprotektiv wirksam (Deng et al., 2014). Allerdings kommt dieser Effekt bei allen Gruppen in gleichem Maße zum Tragen, so dass sich der Effekt nicht auf die Ergebnisse auswirken dürfte.

24 Stunden nach Ischämie wurden die Tiere dekapitiert. Der Zeitpunkt von 24 Stunden nach Ischämie liegt im frühen post-ischämischen Zeitraum und liegt – bei Mäusen und bei Menschen – innerhalb des Zeitraums, in dem das Gewebe der Penumbra noch zu retten ist, sofern sich die dort grenzwertige Perfusion innerhalb von 48 Stunden normalisiert (vergleiche 2.1.5 und Heiss und Podreka (2005), Ferrer et al. (2008), Wei und Dore (2010)).

Die Mortalität von insgesamt 17,3 % der Tiere lag etwas unterhalb derjenigen von 20 % in der vorangegangenen, methodisch identischen Arbeit (Sevimli et al., 2009) sowie im Bereich der in der Literatur angegebenen Mortalitätsraten (beispielsweise Rousselet et al. (2012)).

Wie in der Vorgängerstudie (Sevimli et al., 2009) wurden weibliche Tiere verwendet, da bis dahin der Nachweis der Effektivität von G-CSF im Schlaganfallmodell bei weiblichen Tieren fehlte. Der Nachweis der Effektivität bei weiblichen Tieren wurde durch die größeren Infarktvolumina und das schlechtere neurologische Outcome bei G-CSF-defizienten Tieren, sowie die Reversibilität des Effektes durch Applikation von G-CSF, erbracht (Sevimli et al., 2009).

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit – wie schon in der vorangegangenen Studie dieser Arbeitsgruppe – keine mit G-CSF substituierten Wildtyp-Tiere untersucht, da diese Studie vor allem das endogene G-CSF-System untersuchen soll. Durch den Vergleich mit nicht substituierten Wildtyp-Tieren und substituierten G-CSF-defizienten Tieren konnte der Effekt der Abwesenheit von G-CSF hinreichend untersucht werden und die Anzahl der Tiere, im Sinne der Vorgaben der Europäischen Union zu Tierversuchen (Europäischer Rat, 1986), weit möglichst reduziert werden.

5.2.2 Analyse der Infarkt volumina

Infarkt volumina wurden volumetrisch durch Analyse von silbergefärbten koronaren Schnitten untersucht. Die Silberfärbung nach Vogel ist bewährt und Infarktgrenzen sind verlässlich auszumachen (siehe Abbildungen 7 und 8; Vogel et al. (1999)).

Bei der Analyse der Silberfärbungen zur Bestimmung der Infarkt volumina fielen schnittbedingt unregelmäßige Ränder der Präparate auf. Die unregelmäßigen Ränder konnten jedoch am Computerbildschirm exakt markiert und somit alle Flächen und Volumina korrekt erfasst werden (vergleiche 3.6 und Abbildungen 7 und 8).

5.2.3 Analyse der Ligandenbindungsdichten

In dieser Studie wurden Areale im Infarktkern sowie die Peri-Infarkt-Areale und Areale auf der kontralateralen Seite untersucht. Es wurden der sekundäre somatosensorische Kortex sowie der piriforme Kortex ausgewählt, da diese Areale bei Okklusion der Arteria cerebri media regelmäßig von Ischämie betroffen sind. So wurden zwei funktionale Kortexareale des Neocortex und Allocortex untersucht, welche beim Menschen häufig von Ischämien betroffen sind (vergleiche 2.1.6 und 2.3.1) und welche aufgrund ihrer Ausbreitung im Kortex verlässlich aufgefunden und am Bildschirm markiert werden konnten.

Die Penumbra ist der dynamische Bereich um den Infarktkern, der durch akute Therapie potentiell noch zu retten ist (siehe Abschnitt 2.1.5). Da Neuroprotektion insbesondere auf die Penumbra abzielt, ist diese für die vorliegende Arbeit besonders relevant. Als Korrelat dieses Bereiches wurden in dieser Arbeit die den Infarktkern umgebende unmittelbare Grenzzone sowie die der unmittelbaren Grenzzone anliegende Grenzzone untersucht (vergleiche Abbildung 9).

Um potentielle Auswirkungen auf nicht infarzierte Kortexareale zu untersuchen, wurde zusätzlich der benachbarte Kortex Rezeptor-autoradiographisch analysiert. Weiterhin wurden die Ligandenbindungsdichten auch in kontralateralen Arealen untersucht.

Die Rezeptor-Autoradiographie als Methode wurde gewählt, weil diese sowohl spezifisch die genaue Lokalisation von Rezeptoren darstellen kann, als auch eine spezifische Markierung unterschiedlicher Rezeptoren erlaubt. Dabei sind quantitative Aussagen über die Ligandenbindung möglich und somit

kann das Vorliegen von Rezeptoren räumlich hochauflösend quantifiziert werden. Weiterhin ist die Rezeptor-Autoradiographie seit Jahrzehnten als Standardtechnik etabliert und validiert (Young und Kuhar, 1979, Watson und Cullinan, 2000).

Nachteile der Rezeptor-Autoradiographie sind notwendige Vorsichtsmaßnahmen bei der Durchführung auf Grund der Radioaktivität der Tritium-markierten Liganden und der auf Grund der 12 Wochen langen Expositionsdauer recht langen Zeit bis zum Vorliegen der Radiographien. Außerdem variiert bei der Rezeptor-Autoradiographie die unspezifische Ligandenbindungsdichte je nach Ligand, was in der Auswertung berücksichtigt werden muss. Dazu wurde in dieser Arbeit die unspezifische Ligandenbindungsdichte im Corpus callosum gemessen und die spezifische Ligandenbindungsdichte errechnet, indem von der gesamten Ligandenbindungsdichte die unspezifische Ligandenbindungsdichte subtrahiert wurde (vergleiche 3.7). (Young und Kuhar, 1979, Watson und Cullinan, 2000).

Für die Rezeptor-Autoradiographie wurden Liganden gewählt, von denen bekannt ist, dass die jeweiligen Rezeptoren potentiell in Neuroprotektion oder Exzitotoxizität involviert sind. Somit konnten mögliche neuroprotektive Wirkmechanismen von G-CSF auf Rezeptorebene untersucht werden. Dabei wurden sowohl exzitatorische Glutamat als auch inhibitorische GABA_A- und 5-HT_{1A}-Rezeptoren untersucht.

Von den Glutamat-Rezeptoren wurden NMDA- und AMPA-Rezeptoren ausgewählt, da es umfangreiche Daten zu ihrem Einfluss im post-ischämischen Gehirn gibt. Sowohl ihre Exzitotoxizität als auch positive Einflüsse in der Erholungsphase sind bekannt (vergleiche 2.3.3 und Sommer et al. (2003), Kristensen et al. (2001), Szenasi et al. (2008)).

GABA_A-Rezeptoren wurden unter anderem ausgewählt, um einen inhibitorischen Rezeptor zu untersuchen. Außerdem sind insbesondere im Hippocampus, welcher in dieser Arbeit eingehend untersucht wurde, positive Effekte der Abschwächung GABAerger Aktivität in der frühen post-ischämischen Phase dokumentiert (Li et al., 2013). Andererseits hat die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren auch neuroprotektive Wirkung (vergleiche 2.3.3 und Kim et al. (2014),).

Auch für Agonisten an inhibitorischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren sind neuroprotektive Effekte in Tiermodellen beschrieben (vergleiche 2.3.3, (Berends et al., 2005, Johansen et al., 2014)).

5.3 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Mäuse sind auf Grund der relativen Leichtigkeit der Genmanipulation die bevorzugte Spezies für Untersuchungen zum zentralen Nervensystem allgemein und insbesondere zu Krankheiten des Menschen (Watson et al., 2011). So wurde auch in dieser Arbeit ein Schlaganfallmodell an G-CSF-defizienten Mäusen verwendet, um das endogene G-CSF und dessen Einflüsse auf die

Ligandenbindungsichte an unterschiedlichen Rezeptoren nach Ischämie in murinen Gehirnen zu verstehen. Diese Erkenntnisse sollen Mechanismen beim Menschen verstehen helfen.

Somit stellt sich die Frage, wie sehr sich die Gehirne von Mäusen und Menschen histologisch und funktionell ähneln und inwieweit Erkenntnisse aus Experimenten an Mäusen auf den Menschen übertragbar sind. Zur Beantwortung dieser Frage sind unzählige Aspekte relevant, von denen eine Auswahl im Folgenden diskutiert werden soll. Welche dieser Aspekte maßgeblich für die Übertragung von Ergebnissen aus Tiermodellen auf den Menschen sind, ist momentan unbekannt (Fisher et al., 2009).

5.3.1 Ähnlichkeit muriner und humaner Gehirne

Die Ähnlichkeiten zwischen dem humanen und dem murinen Kortex sind „recht oberflächlich – Proteinsequenzen, Wachstumsmuster, Ähnlichkeiten zwischen Neuronen- und Gliophänotypen und eine gemeinsame Organisationsstruktur. [...] die substantiellen Unterschiede zwischen murinem und humanem Kortex sollten [...] anerkannt und respektiert werden“ (Watson et al., 2011).

In funktioneller Hinsicht besteht der größte Unterschied zwischen humanem und murinem Neokortex darin, dass dieser bei Menschen zielstrebigem Handeln dient. Mäusen dient der Neokortex zwar zur Bewegungssteuerung, aber die kortikale Kontrolle der Motorik ist bei Mäusen weit weniger direkt als bei Menschen (Watson et al., 2011).

In struktureller Hinsicht haben murine und humane Gehirne große Ähnlichkeiten, aber auch grundlegende Unterschiede: Makroskopisch unterscheiden sich murine und humane Gehirne in der Gyrierung, welche bei den lissenzephalen Mäusen nicht vorhanden ist, aber beim gyrenzephalen Menschen eine größere Kortexoberfläche ermöglicht (Schiebler und Korf, 2007). Auch das Verhältnis von Gehirn- zu Körpergewicht ist zwischen den beiden Spezies unterschiedlich, allerdings ist das Verhältnis von kortikalen zu zerebellären Neuronen sehr ähnlich. Auf der mikroskopischen Ebene ist der schichtweise Aufbau, sowie die Neurone in den Schichten des Neokortex der beiden Spezies vergleichbar. Unterschiedlich ist die Dichte der Neurone im Neocortex; diese ist bei Mäusen höher. Die Anzahl von Interneuronen und Gliazellen ist bei Mäusen geringer als beim Menschen (Watson et al., 2011). Weiterhin hat das menschliche Gehirn einen weit größeren Anteil an weißer Substanz als das Gehirn von Nagern (Fisher et al., 2009).

Im Neokortex sind außerdem die Schichten 2 und 3 bei Mäusen dünner und weniger differenziert als bei Primaten. Somit werden diese zusammengefasst zu Schicht 2/3. Die bei Nagern vorhandene Schicht 7 ist beim Menschen nicht vorhanden (vergleiche 2.3.1 und Watson et al. (2011).

Das Verhältnis von erregenden zu hemmenden Synapsen ist im Kortex von Mäusen etwas niedriger als in dem von Menschen. Der murine Kortex beherbergt proportional weniger Neurone als der humane Kortex (DeFelipe et al., 2002).

Die dargestellten strukturellen und funktionellen Unterschiede zwischen murinen und humanen Gehirnen könnten mit dafür verantwortlich sein, dass die Translation von Ergebnissen aus Schlaganfallmodellen in die klinische Medizin bisher weitgehend erfolglos war. Es ist jedoch beispielsweise umstritten, ob das Verwenden lissenzephaler Tiere in Schlaganfall-Modellen einen Nachteil darstellt (Mergenthaler und Meisel, 2012, Cook und Tymianski, 2012).

5.3.2 Alterungsprozesse

In der vorliegenden Arbeit wurden wie in den meisten anderen Tierstudien zu Neuroprotektiva keine alten Tiere verwendet. Die meisten Schlaganfälle bei Menschen ereignen sich jedoch bei Menschen im höheren Lebensalter.

Alterungsprozesse beeinträchtigen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik und somit die Sicherheit und Effektivität von Pharmaka (Fisher et al., 2009). Während G-CSF auch bei älteren Menschen in der Anwendung sicher ist (Moriya et al., 2013), geht ein höheres Lebensalter generell mit einem erhöhten Risiko für hämorrhagische Transformation nach Thrombolyse einher (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Weiterhin ist bei älteren Menschen die Regenerationsfähigkeit des Gehirns nach Ischämie eingeschränkt (Fisher et al., 2009, Hattiangady et al., 2008).

Obwohl bei älteren Versuchstieren die Mortalität in Schlaganfallmodellen höher ist, könnten Experimente an älteren Tieren die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Studien an Schlaganfallmodellen auf den Menschen erhöhen. Insbesondere bei potentiellen Neuroprotektiva, bei denen die klinische Anwendung in absehbarer Nähe erscheint – wie dies bei G-CSF der Fall war und noch ist – sollten Alterungsprozesse berücksichtigt werden (Mergenthaler und Meisel, 2012).

5.3.3 Begleiterkrankungen

In der vorliegenden Arbeit wurden gesunde Tiere verwendet. Im Gegensatz dazu leiden Schlaganfallpatienten häufig unter Begleiterkrankungen. Einige dieser Begleiterkrankungen, welche Mechanismen von Neuroprotektion oder die physiologische Regeneration nach Ischämie beeinträchtigen, werden im Folgenden dargelegt.

Schlaganfallpatienten leiden in circa einem Drittel der Fälle unter hohem Blutdruck, welcher den wichtigsten Risikofaktor für Schlaganfälle darstellt (vergleiche 2.1.3). Arterielle Hypertonie beeinträchtigt nicht nur die Blutgefäße an sich, sondern auch die Kompensationsmechanismen der neurovaskulären Einheit nach Ischämie. Die physiologische Fähigkeit von Neuronen, Gliazellen, Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen zur Induktion von Vasodilatation in aktivierten Hirnarealen ist in Individuen mit arterieller Hypertonie herabgesetzt. Somit ist der zerebrale Blutfluss in ischämischen Arealen doppelt beeinträchtigt: Zum einen durch die akute Ischämie und zum anderen

durch die chronische Schädigung der neurovaskulären Einheit (Girouard und Iadecola, 2006). Diese Effekte sind in Tiermodellen des ischämischen Schlaganfalles wenig untersucht, unter anderem auf Grund der Heterogenität der verfügbaren Hypertonie-Modelle (Fisher et al., 2009).

Diabetes und Hyperglykämie, welche ebenfalls bei circa einem Drittel der Schlaganfallpatienten vorliegen, verursachen vaskuläre Veränderungen, welche wiederum Vasokonstriktion, Thrombusbildung und Inflammation begünstigen. Somit sind Gefäße von Patienten mit Diabetes oder Hyperglykämie empfindlicher für Reperfusionsschäden (Martini und Kent, 2007).

Circa ein Drittel der Schlaganfallpatienten raucht Zigaretten. Zigarettenrauchen erhöht das relative Risiko um bis das Vierfache (vergleiche 2.1.3) und verschlechtert das funktionelle Outcome bei ischämischem Schlaganfall. So ist Nikotin verantwortlich für größere Hirnödeme bei Rauchern (Paulson et al., 2010) sowie eine geringere ischämische Toleranz durch eine verringerte Aktivität von Glukose-Transportern (Shah et al., 2015).

Auch die Abbildung von Komorbiditäten (ähnlich wie die von Alterungsprozessen) könnte die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Studien an Schlaganfallmodellen auf den Menschen verbessern. (Mergenthaler und Meisel, 2012).

5.3.4 Komedikation

Komedikation hat sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf das Outcome nach einem Schlaganfall (Goldstein, 1998). Da es schwierig ist, Interaktionen von Pharmaka in Tiermodellen zu untersuchen, wurde dieser Faktor bislang kaum systematisch untersucht. Nach den Empfehlungen des *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* sollten Komedikation und die daraus resultierenden Interaktionen aber zumindest in Betracht gezogen werden (Fisher et al., 2009).

5.3.5 Biphasizität von Neuroprotektiva

Viele Neuroprotektiva haben in der akuten Phase nach cerebraler Ischämie eine protektive Wirkung, in der Erholungsphase jedoch eine schädigende Wirkung (vergleiche 5.1.1 und Lo (2008b)).

So hat beispielsweise die Überaktivität von NMDA-Rezeptoren im akuten Zeitraum nach Ischämie die Aktivierung verschiedener biochemischer Kaskaden zur Folge, welche wiederum zum Untergang von Neuronen führen. In der Erholungsphase scheinen NMDA-Rezeptoren allerdings anti-apoptotisch und neurogenetisch zu wirken (Arvidsson et al., 2001, Ikonomidou et al., 2000).

Auch für AMPA-Rezeptoren ist diese Biphasizität beschrieben: Die Prävention von AMPA-Rezeptor-assoziiierter Exzitotoxizität durch G-CSF im frühen Zeitraum nach zerebraler Ischämie hat neuroprotektive Wirkung, allerdings ist in der chronischen Phase nach Ischämie die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren und anderen Glutamat-Rezeptoren eine Voraussetzung für erfolgreiche

Regeneration und verbessertes neurologisches Outcome (vergleiche 2.3.3 und Carmichael (2012), Muller et al. (2008), Diederich et al. (2012)).

Um Neuroprotektiva trotz ihrer Biphasizität klinisch erfolgreich zu nutzen, muss der Zeitraum bekannt sein, in welchem sie tatsächlich protektiv wirken und ab wann negative Auswirkungen vorherrschen (Lo, 2008b).

In dem in dieser Arbeit dargestellten Experiment sowie in der Vorstudie wurden Untersuchungszeitpunkte 24 beziehungsweise 48 Stunden nach Ischämie gewählt (Sevimli et al., 2009). Diese Zeiträume liegen im frühen postischämischen Zeitraum. In der frühen postischämischen Phase sind die modulatorischen Effekte von Neuroprotektiva auf die Freisetzung von insbesondere erregenden Neurotransmittern am stärksten ausgeprägt. So sind beispielsweise von vielen anderen Substanzen bereits neuroprotektive Effekte bekannt, welche im frühen post-ischämischen Zeitraum über die Reduktion der Aktivität von Glutamat-Rezeptoren vermittelt werden (Ndeltchev und Mattle, 2014, Onwuekwe und Ezeala-Adikaibe, 2012). Um einen möglichen ähnlichen Mechanismus für G-CSF zu dokumentieren, wurde für diese Arbeit der frühe post-ischämische Zeitraum als Untersuchungszeitpunkt gewählt.

5.3.6 Fazit

Die vorliegende Arbeit untersucht Mechanismen der Neuroprotektion durch endogenes G-CSF an einem Tiermodell. Wie in diesem Abschnitt erkennbar wurde, kann ein Tiermodell nicht alle Faktoren abbilden, die in der post-ischämischen Phase bei Schlaganfallpatienten Einfluss auf biochemische Prozesse und das funktionelle Outcome haben.

Als Grundlagenarbeit hat dieses Experiment zwar nicht den Anspruch, diese Faktoren alle abzubilden, aber dennoch ergeben sich Konsequenzen für die Anwendbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen: Unter anderem können Unterschiede in Gehirnstruktur und -funktion zwischen Versuchstieren und Menschen sowie das Vorliegen von Alterungsprozessen, Begleiterkrankungen und Komedikation bei Schlaganfallpatienten und nicht zuletzt die unterschiedlichen Einflüsse von Ansatzpunkten von Neuroprotektiva zu verschiedenen Zeiträumen nach Ischämie zum Teil erklären, warum viele erfolgversprechende Neuroprotektiva bei Schlaganfallpatienten nicht die erhoffte Wirkung zeigten (Sutherland et al., 2012, Minnerup et al., 2012).

Hier sind weitere Experimente und neue Ansätze notwendig, um die Anwendbarkeit von Tiermodellen auf das multifaktorielle Krankheitsbild des ischämischen Schlaganfalles zu erhöhen – mit dem Ziel, die besten Therapieansätze für Schlaganfallpatienten zu finden (Fisher et al., 2009, Lo, 2008a).

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss des endogenen G-CSF-Systems auf neuronale Rezeptorbindungsichten und insbesondere die Auswirkungen der Abwesenheit von G-CSF im zentralen Nervensystem 24 Stunden nach fokaler Ischämie. Dazu wurden Infarktvolumina sowie die Ligandenbindungsichten an exzitatorischen NMDA- und AMPA-Rezeptoren und den inhibitorischen GABA_A- und 5-HT_{1A}-Rezeptoren in Kortexarealen im Infarktkern, im peri-ischämischen und kontralateralen Kortex sowie in Hippocampus-Arealen untersucht.

Dazu wurde bei 40 Mäusen über 45 Minuten die Arteria cerebri media okkludiert, 24 Stunden später wurden die Gehirne entnommen und koronare Schnitte angefertigt. Schnitte im Abstand von 1 mm wurden silbergefärbt und Infarktvolumina volumetrisch bestimmt. Schnitte auf Höhe des Striatums und Hippocampus wurden mit [³H]AMPA, [³H]MK801, [³H]Muscimol und [³H]8-OH-DPAT Rezeptorautoradiographisch untersucht. Die Tiere waren in drei Gruppen aufgeteilt: Wildtyp-Tiere, G-CSF-defiziente Mäuse und G-CSF-defiziente Mäuse, welchen G-CSF substituiert wurde.

Es zeigte sich, dass im frühen post-ischämischen Zeitraum 24 Stunden nach Reperfusion die Infarktvolumina zwischen G-CSF-defizienten Mäusen und Wildtyp-Tieren noch nicht statistisch signifikant unterschiedlich waren. Dies war ein überraschendes Ergebnis, da sich 48 Stunden nach Ischämie bei G-CSF-defizienten Tieren größere Infarkte zeigten als bei Wildtyp-Tieren (Sevimli et al., 2009). Für diesen Befund bietet sich die Erklärungsmöglichkeit, dass in den Arealen um den Infarkt sowie in kontralateralen Kortexarealen die Ligandenbindungsichte an AMPA-Rezeptoren in G-CSF-defizienten Tieren erhöht war. Dieser Effekt scheint spezifisch auf die Abwesenheit von G-CSF zurückzuführen zu sein, da die Ligandenbindungsichten der Tiere, denen G-CSF substituiert wurde, weitgehend denen der Wildtyp-Tiere entsprachen. Somit scheint die Prävention post-ischämischer AMPA-Rezeptor-Hochregulation, neben den bereits bekannten, ein weiterer, bisher in der Literatur noch nicht beschriebener neuroprotektiver Mechanismus von G-CSF zu sein.

Weiterhin untermauern die im sehr frühen Zeitraum nach Ischämie noch nicht signifikant unterschiedlichen Infarktvolumina die Erkenntnis, dass es problematisch ist, Infarktvolumina nur zu einem Zeitpunkt zu bestimmen – vorzuziehen wäre, die Bestimmung von Infarktvolumina zu mehreren Zeitpunkten.

In Anbetracht der Tatsache, dass G-CSF in einer ersten großen klinischen Studie bei Schlaganfallpatienten keinen erkennbaren neuroprotektiven Effekt hatte, stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierstudien mit erfolgversprechenden Neuroprotektiva auf den Menschen. Während Tiermodelle nicht den Anspruch haben, alle Faktoren abzubilden, die in der post-ischämischen Phase bei Schlaganfallpatienten Einfluss auf biochemische Prozesse und das funktionelle Outcome haben, ergeben sich dennoch Konsequenzen für die Anwendbarkeit dieser Ergebnisse auf

den Menschen: Unter anderem können Unterschiede in Gehirnstruktur und -funktion zwischen Versuchstieren und Menschen sowie das Vorliegen von Alterungsprozessen, Begleiterkrankungen und Komedikationen bei Schlaganfallpatienten und nicht zuletzt die unterschiedlichen Einflüsse von Ansatzpunkten von Neuroprotektiva zu verschiedenen Zeiträumen nach Ischämie zum Teil erklären, warum viele erfolgversprechende Neuroprotektiva bei Schlaganfallpatienten häufig nicht die erhoffte Wirkung zeigen.

7. Literaturverzeichnis

- ARVIDSSON, A., KOKAIA, Z. & LINDVALL, O. 2001. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci*, 14, 10-8.
- ASTRUP, J., SIESJO, B. K. & SYMON, L. 1981. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*, 12, 723-5.
- AVALOS, B. R. 1996. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*, 88, 761-77.
- BELAYEV, L., KHOUTOROVA, L., DEISHER, T. A., BELAYEV, A., BUSTO, R., ZHANG, Y., ZHAO, W. & GINSBERG, M. D. 2003. Neuroprotective effect of SolCD39, a novel platelet aggregation inhibitor, on transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 34, 758-63.
- BERENDS, A. C., LUITEN, P. G. & NYAKAS, C. 2005. A review of the neuroprotective properties of the 5-HT_{1A} receptor agonist repinotan HCl (BAYx3702) in ischemic stroke. *CNS Drug Rev*, 11, 379-402.
- BONEBERG, E. M., HARENG, L., GANTNER, F., WENDEL, A. & HARTUNG, T. 2000. Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. *Blood*, 95, 270-6.
- BUSSOLINO, F., WANG, J. M., DEFILIPPI, P., TURRINI, F., SANAVIO, F., EDGELL, C. J., AGLIETTA, M., ARESE, P. & MANTOVANI, A. 1989. Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature*, 337, 471-3.
- CARMICHAEL, S. T. 2005. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*, 2, 396-409.
- CARMICHAEL, S. T. 2012. Brain excitability in stroke: the yin and yang of stroke progression. *Arch Neurol*, 69, 161-7.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2016. *Stroke Fact Sheet* [Online]. Atlanta, GA, USA. Verfügbar unter: http://www.cdc.gov/dhdsdp/data_statistics/fact_sheets/fs_stroke.htm 2016].
- COOK, D. J. & TYMIANSKI, M. 2012. Nonhuman primate models of stroke for translational neuroprotection research. *Neurotherapeutics*, 9, 371-9.
- DE GEORGIA, M. A., KRIEGER, D. W., ABOU-CHEBL, A., DEVLIN, T. G., JAUSS, M., DAVIS, S. M., KOROSHETZ, W. J., RORDORF, G. & WARACH, S. 2004. Cooling for Acute Ischemic Brain Damage (COOL AID): a feasibility trial of endovascular cooling. *Neurology*, 63, 312-7.
- DEFELIPE, J., ALONSO-NANCLARES, L. & ARELLANO, J. I. 2002. Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J Neurocytol*, 31, 299-316.
- DEMETRI, G. D. & GRIFFIN, J. D. 1991. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*, 78, 2791-808.
- DEMIRER, T., AYLI, M., OZCAN, M., GUNEL, N., HAZNEDAR, R., DAGLI, M., FEN, T., GENÇ, Y., DINCER, S., ARSLAN, O., GURMAN, G., DEMIRER, S., OZET, G., UYSAL, A., KONUK, N., ILHAN, O., KOC, H. & AKAN, H. 2002. Mobilization of peripheral blood stem cells with chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF): a randomized evaluation of different doses of rhG-CSF. *Br J Haematol*, 116, 468-74.
- DENG, J., LEI, C., CHEN, Y., FANG, Z., YANG, Q., ZHANG, H., CAI, M., SHI, L., DONG, H. & XIONG, L. 2014. Neuroprotective gases--fantasy or reality for clinical use? *Prog Neurobiol*, 115, 210-45.
- DIEDERICH, K., QUENNET, V., BAUER, H., MULLER, H. D., WERSCHING, H., SCHABITZ, W. R., MINNERUP, J. & SOMMER, C. 2012. Successful regeneration after experimental stroke by granulocyte-colony stimulating factor is not further enhanced by constraint-induced movement therapy either in concurrent or in sequential combination therapy. *Stroke*, 43, 185-92.
- DINGLEDINE, R., BORGES, K., BOWIE, D. & TRAYNELIS, S. F. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, 51, 7-61.
- DONNAN, G. A., FISHER, M., MACLEOD, M. & DAVIS, S. M. 2008. Stroke. *Lancet*, 371, 1612-23.
- DREIER, J. P. 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med*, 17, 439-47.
- DUNING, T., SCHIFFBAUER, H., WARNECKE, T., MOHAMMADI, S., FLOEL, A., KOLPATZIK, K., KUGEL, H., SCHNEIDER, A., KNECHT, S., DEPPE, M. & SCHABITZ, W. R. 2011. G-CSF prevents the progression of structural disintegration of white matter tracts in amyotrophic lateral sclerosis: a pilot trial. *PLoS One*, 6, e17770.

EUROPÄISCHER RAT 1986. Richtlinie 86/609/EWG des Rates vom 24. November 1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere Amtsblatt Nr. L 358 vom 18/12/1986 S. 0001 - 0028.

FATAHZADEH, M. & GLICK, M. 2006. Stroke: epidemiology, classification, risk factors, complications, diagnosis, prevention, and medical and dental management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102, 180-91.

FEREZOU, I., BOLEA, S. & PETERSEN, C. C. 2006. Visualizing the cortical representation of whisker touch: voltage-sensitive dye imaging in freely moving mice. *Neuron*, 50, 617-29.

FERRER, I., KASTE, M. & KALIMO, H. 2008. *Greenfield's Neuropathology*, London, Edward Arnold Ltd.

FILIP, M. & BADER, M. 2009. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep*, 61, 761-77.

FISHER, M. & BASTAN, B. 2012. Identifying and utilizing the ischemic penumbra. *Neurology*, 79, S79-85.

FISHER, M., FEUERSTEIN, G., HOWELLS, D. W., HURN, P. D., KENT, T. A., SAVITZ, S. I., LO, E. H. & GROUP, S. 2009. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke*, 40, 2244-50.

FOXWELL, B. M., BARRETT, K. & FELDMANN, M. 1992. Cytokine receptors: structure and signal transduction. *Clin Exp Immunol*, 90, 161-9.

FRAMPTON, J. E., LEE, C. R. & FAULDS, D. 1994. Filgrastim. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. *Drugs*, 48, 731-60.

FRAUENKNECHT, K., BARGIOTAS, P., BAUER, H., VON LANDENBERG, P., SCHWANINGER, M. & SOMMER, C. 2010. Neuroprotective effect of Fn14 deficiency is associated with induction of the granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) pathway in experimental stroke and enhanced by a pathogenic human antiphospholipid antibody. *J Neuroimmunol*, 227, 1-9.

FRAUENKNECHT, K., KATZAV, A., GRIMM, C., CHAPMAN, J. & SOMMER, C. J. 2013. Neurological impairment in experimental antiphospholipid syndrome is associated with increased ligand binding to hippocampal and cortical serotonergic 5-HT1A receptors. *Immunobiology*, 218, 517-26.

FUKUNAGA, R., ISHIZAKA-IKEDA, E., SETO, Y. & NAGATA, S. 1990. Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Cell*, 61, 341-50.

GIBSON, C. L., BATH, P. M. & MURPHY, S. P. 2005. G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25, 431-9.

GIROUARD, H. & IADECOLA, C. 2006. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol (1985)*, 100, 328-35.

GOLDSTEIN, L. B. 1998. Potential effects of common drugs on stroke recovery. *Arch Neurol*, 55, 454-6.

GOLDSTEIN, L. B. & HANKEY, G. J. 2006. Advances in primary stroke prevention. *Stroke*, 37, 317-9.

HACKE, W., KASTE, M., BLUHMKI, E., BROZMAN, M., DAVALOS, A., GUIDETTI, D., LARRUE, V., LEES, K. R., MEDEGHRI, Z., MACHNIG, T., SCHNEIDER, D., VON KUMMER, R., WAHLGREN, N., TONI, D. & INVESTIGATORS, E. 2008. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 359, 1317-29.

HARTUNG, T. 1998. Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*, 5, 221-5.

HATA, R., MIES, G., WIESSNER, C., FRITZE, K., HESSELBARTH, D., BRINKER, G. & HOSSMANN, K. A. 1998. A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: hemodynamic, biochemical, and magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18, 367-75.

HATTIANGADY, B., RAO, M. S. & SHETTY, A. K. 2008. Plasticity of hippocampal stem/progenitor cells to enhance neurogenesis in response to kainate-induced injury is lost by middle age. *Aging Cell*, 7, 207-24.

HEISS, W. & PODREKA, I. 2005. *Pathology and genetics: cerebrovascular diseases*, Basel, ISN Neuropath Press.

HEISS, W. D., GRAF, R., WIENHARD, K., LOTTGEN, J., SAITO, R., FUJITA, T., ROSNER, G. & WAGNER, R. 1994. Dynamic penumbra demonstrated by sequential multitracer PET after middle cerebral artery occlusion in cats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14, 892-902.

HEMMEN, T. M., RAMAN, R., GULUMA, K. Z., MEYER, B. C., GOMES, J. A., CRUZ-FLORES, S., WIJMAN, C. A., RAPP, K. S., GROTTA, J. C., LYDEN, P. D. & INVESTIGATORS, I. C.-L. 2010. Intravenous thrombolysis plus hypothermia for acute treatment of ischemic stroke (ICTuS-L): final results. *Stroke*, 41, 2265-70.

- HERMANN, D. M., KILIC, E., HATA, R., HOSSMANN, K. A. & MIES, G. 2001. Relationship between metabolic dysfunctions, gene responses and delayed cell death after mild focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*, 104, 947-55.
- HILL, C. P., OSSLUND, T. D. & EISENBERG, D. 1993. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 5167-71.
- HU, B. & YASUI, K. 1997. Effects of colony-stimulating factors (CSFs) on neutrophil apoptosis: possible roles at inflammation site. *Int J Hematol*, 66, 179-88.
- IKONOMIDOU, C., STEFOVSKA, V. & TURSKEI, L. 2000. Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12885-90.
- JAUCH, E. C., SAVER, J. L., ADAMS, H. P., JR., BRUNO, A., CONNORS, J. J., DEMAERSCHALK, B. M., KHATRI, P., MCMULLAN, P. W., JR., QURESHI, A. I., ROSENFELD, K., SCOTT, P. A., SUMMERS, D. R., WANG, D. Z., WINTERMARK, M., YONAS, H., AMERICAN HEART ASSOCIATION STROKE, C., COUNCIL ON CARDIOVASCULAR, N., COUNCIL ON PERIPHERAL VASCULAR, D. & COUNCIL ON CLINICAL, C. 2013. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 44, 870-947.
- JOHANSEN, F. F., HASSELDAM, H., NYBRO SMITH, M. & RASMUSSEN, R. S. 2014. Drug-induced hypothermia by 5HT1A agonists provide neuroprotection in experimental stroke: new perspectives for acute patient treatment. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 23, 2879-87.
- JOHNSEN, H. E., HANSEN, P. B., PLESNER, T., JENSEN, L., GAARSDAL, E., ANDERSEN, H., HANSEN, S. W., BIRGENS, H., JACOBSEN, G. K., KJAERGAARD, E. & ET AL. 1992. Increased yield of myeloid progenitor cells in bone marrow harvested for autologous transplantation by pretreatment with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. *Bone Marrow Transplant*, 10, 229-34.
- KAUSHANSKY, K., LIN, N. & ADAMSON, J. W. 1988. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. Mechanism for the hematopoietic response to inflammation. *J Clin Invest*, 81, 92-7.
- KAWADA, H., TAKIZAWA, S., TAKANASHI, T., MORITA, Y., FUJITA, J., FUKUDA, K., TAKAGI, S., OKANO, H., ANDO, K. & HOTTA, T. 2006. Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation*, 113, 701-10.
- KIDWELL, C. S. & WARACH, S. 2003. Acute ischemic cerebrovascular syndrome: diagnostic criteria. *Stroke*, 34, 2995-8.
- KIM, Y. K., YANG, E. J., CHO, K., LIM, J. Y. & PAIK, N. J. 2014. Functional Recovery After Ischemic Stroke Is Associated With Reduced GABAergic Inhibition in the Cerebral Cortex: A GABA PET Study. *Neurorehabil Neural Repair*, 28, 576-583.
- KLÖTZSCH, C. & POPESCU, O. 2006. Zerebrale Ischämien. In: BERLIT, P. (ed.) *Klinische Neurologie*. 2 ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- KNECHT, T., STORY, J., LIU, J., DAVIS, W., BORLONGAN, C. V. & DELA PENA, I. C. 2017. Adjunctive Therapy Approaches for Ischemic Stroke: Innovations to Expand Time Window of Treatment. *Int J Mol Sci*, 18.
- KOEFLER, H. P., GASSON, J., RANYARD, J., SOUZA, L., SHEPARD, M. & MUNKER, R. 1987. Recombinant human TNF alpha stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 70, 55-9.
- KOLOMINSKY-RABAS, P. 2004. Schlaganfall in Deutschland. Anhaltszahlen zum Schlaganfall in Deutschland aus dem bevölkerungsbasierten Erlanger Schlaganfall-Register im Rahmen der Gesundheitsberichterstattung des Bundes.
- KOLOMINSKY-RABAS, P. L., HEUSCHMANN, P. U., MARSCHALL, D., EMMERT, M., BALTZER, N., NEUNDORFER, B., SCHOFFSKI, O. & KROBOT, K. J. 2006. Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke*, 37, 1179-83.
- KOMINE-KOBAYASHI, M., ZHANG, N., LIU, M., TANAKA, R., HARA, H., OSAKA, A., MOCHIZUKI, H., MIZUNO, Y. & URABE, T. 2006. Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26, 402-13.
- KRISTENSEN, B. W., NORABERG, J. & ZIMMER, J. 2001. Comparison of excitotoxic profiles of ATPA, AMPA, KA and NMDA in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res*, 917, 21-44.

- KRUGER, C., LAAGE, R., PITZER, C., SCHABITZ, W. R. & SCHNEIDER, A. 2007. The hematopoietic factor GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) promotes neuronal differentiation of adult neural stem cells in vitro. *BMC Neurosci*, 8, 88.
- KULLER, L. H. 2000. Epidemiology and prevention of stroke, now and in the future. *Epidemiol Rev*, 22, 14-7.
- LEE, S. T., CHU, K., JUNG, K. H., KO, S. Y., KIM, E. H., SINN, D. I., LEE, Y. S., LO, E. H., KIM, M. & ROH, J. K. 2005. Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 1058, 120-8.
- LI, W., HUANG, R., SHETTY, R. A., THANGTHAENG, N., LIU, R., CHEN, Z., SUMIEN, N., RUTLEDGE, M., DILLON, G. H., YUAN, F., FORSTER, M. J., SIMPKINS, J. W. & YANG, S. H. 2013. Transient focal cerebral ischemia induces long-term cognitive function deficit in an experimental ischemic stroke model. *Neurobiol Dis*, 59, 18-25.
- LIESCHKE, G. J., GRAIL, D., HODGSON, G., METCALF, D., STANLEY, E., CHEERS, C., FOWLER, K. J., BASU, S., ZHAN, Y. F. & DUNN, A. R. 1994. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*, 84, 1737-46.
- LIPTON, P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79, 1431-568.
- LO, E. H. 2008a. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1, S396-405.
- LO, E. H. 2008b. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med*, 14, 497-500.
- LUNDBLAD, R., NESLAND, J. M. & GIERCKSKY, K. E. 1996. Granulocyte colony-stimulating factor improves survival rate and reduces concentrations of bacteria, endotoxin, tumor necrosis factor, and endothelin-1 in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. *Crit Care Med*, 24, 820-6.
- MAMMELE, S., FRAUENKNECHT, K., SEVIMLI, S., DIEDERICH, K., BAUER, H., MINNERUP, J., SCHABITZ, W. R. & SOMMER, C. J. 2015. Prevention of an increase in cortical ligand binding to AMPA receptors may represent a novel mechanism of endogenous brain protection by G-CSF after ischemic stroke. *Restor Neurol Neurosci*.
- MARTINI, S. R. & KENT, T. A. 2007. Hyperglycemia in acute ischemic stroke: a vascular perspective. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 435-51.
- MCCANN, S. K., IRVINE, C., MEAD, G. E., SENA, E. S., CURRIE, G. L., EGAN, K. E., MACLEOD, M. R. & HOWELLS, D. W. 2014. Efficacy of antidepressants in animal models of ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Stroke*, 45, 3055-63.
- MENZIE-SUDERAM, J. M., MOHAMMAD-GHARIBANI, P., MODI, J., MA, Z., TAO, R., PRENTICE, H. & WU, J. Y. 2018. Granulocyte-colony stimulating factor protects against endoplasmic reticulum stress in an experimental model of stroke. *Brain Res*, 1682, 1-13.
- MERGENTHALER, P. & MEISEL, A. 2012. Do stroke models model stroke? *Dis Model Mech*, 5, 718-25.
- MINNERUP, J., SEVIMLI, S. & SCHABITZ, W. R. 2009. Granulocyte-colony stimulating factor for stroke treatment: mechanisms of action and efficacy in preclinical studies. *Exp Transl Stroke Med*, 1, 2.
- MINNERUP, J., SUTHERLAND, B. A., BUCHAN, A. M. & KLEINSCHNITZ, C. 2012. Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives. *Int J Mol Sci*, 13, 11753-72.
- MORIYA, Y., MIZUMA, A., UESUGI, T., OHNUKI, Y., NAGATA, E., TAKAHASHI, W., KOBAYASHI, H., KAWADA, H., ANDO, K., TAKAGI, S. & TAKIZAWA, S. 2013. Phase I study of intravenous low-dose granulocyte colony-stimulating factor in acute and subacute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 22, 1088-97.
- MULLER, H. D., HANUMANTHIAH, K. M., DIEDERICH, K., SCHWAB, S., SCHABITZ, W. R. & SOMMER, C. 2008. Brain-derived neurotrophic factor but not forced arm use improves long-term outcome after photothrombotic stroke and transiently upregulates binding densities of excitatory glutamate receptors in the rat brain. *Stroke*, 39, 1012-21.
- NAGATA, S., TSUCHIYA, M., ASANO, S., KAZIRO, Y., YAMAZAKI, T., YAMAMOTO, O., HIRATA, Y., KUBOTA, N., OHEDA, M., NOMURA, H. & ET AL. 1986. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*, 319, 415-8.
- NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE RT-PA STROKE STUDY GROUP 1995. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med*, 333, 1581-7.

- NDELTCHEV, K. & MATTLE, H. P. 2014. Oxford Textbook of Stroke and Cerebrovascular Disease. Oxford University Press.
- NEIDHART, J., MANGALIK, A., KOHLER, W., STIDLEY, C., SAIKI, J., DUNCAN, P., SOUZA, L. & DOWNING, M. 1989. Granulocyte colony-stimulating factor stimulates recovery of granulocytes in patients receiving dose-intensive chemotherapy without bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*, 7, 1685-92.
- NICOLA, N. A. 1989. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem*, 58, 45-77.
- OLSEN, R. W. & TOBIN, A. J. 1990. Molecular biology of GABAA receptors. *FASEB J*, 4, 1469-80.
- ONWUEKWE, I. & EZEALA-ADIKAIBE, B. 2012. Ischemic stroke and neuroprotection. *Ann Med Health Sci Res*, 2, 186-90.
- PAULSON, J. R., YANG, T., SELVARAJ, P. K., MDZINARISHVILI, A., VAN DER SCHYF, C. J., KLEIN, J., BICKEL, U. & ABBRUSCATO, T. J. 2010. Nicotine exacerbates brain edema during in vitro and in vivo focal ischemic conditions. *J Pharmacol Exp Ther*, 332, 371-9.
- PAXINOS, G. & FRANKLIN, K. B. J. 1997. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, San Diego, CA, USA, Academic Press.
- PAXINOS, G. & FRANKLIN, K. B. J. 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, San Diego, CA, USA, Academic Press.
- PITZER, C., KLUSSMANN, S., KRUGER, C., LETELLIER, E., PLAAS, C., DITTGEN, T., KIRSCH, F., STIELTJES, B., WEBER, D., LAAGE, R., MARTIN-VILLALBA, A. & SCHNEIDER, A. 2010. The hematopoietic factor granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in experimental spinal cord injury. *J Neurochem*, 113, 930-42.
- PITZER, C., KRUGER, C., PLAAS, C., KIRSCH, F., DITTGEN, T., MULLER, R., LAAGE, R., KASTNER, S., SUESS, S., SPOELGEN, R., HENRIQUES, A., EHRENREICH, H., SCHABITZ, W. R., BACH, A. & SCHNEIDER, A. 2008. Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 131, 3335-47.
- POECK, K. & HACKE, W. 2006. *Neurologie*, Heidelberg, Springer.
- POWERS, W. J., DERDEYN, C. P., BILLER, J., COFFEY, C. S., HOH, B. L., JAUCH, E. C., JOHNSTON, K. C., JOHNSTON, S. C., KHALESSI, A. A., KIDWELL, C. S., MESCHIA, J. F., OVBIAGELE, B., YAVAGAL, D. R. & AMERICAN HEART ASSOCIATION STROKE, C. 2015. 2015 American Heart Association/American Stroke Association Focused Update of the 2013 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke Regarding Endovascular Treatment: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 46, 3020-35.
- PRAKASH, A., CHOPRA, K. & MEDHI, B. 2013. Granulocyte-colony stimulating factor improves Parkinson's disease associated with co-morbid depression: an experimental exploratory study. *Indian J Pharmacol*, 45, 612-5.
- RHA, J. H. & SAVER, J. L. 2007. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke*, 38, 967-73.
- RIDWAN, S., BAUER, H., FRAUENKNECHT, K., HEFTI, K., VON PEIN, H. & SOMMER, C. J. 2014. Distribution of the hematopoietic growth factor G-CSF and its receptor in the adult human brain with specific reference to Alzheimer's disease. *J Anat*, 224, 377-91.
- RINGELSTEIN, E. B., THIJIS, V., NORRVING, B., CHAMORRO, A., AICHNER, F., GROND, M., SAVER, J., LAAGE, R., SCHNEIDER, A., RATHGEB, F., VOGT, G., CHARISSE, G., FIEBACH, J. B., SCHWAB, S., SCHABITZ, W. R., KOLLMAR, R., FISHER, M., BROZMAN, M., SKOLOUDIK, D., GRUBER, F., SERENA LEAL, J., VELTKAMP, R., KOHRMANN, M., BERROUSCHOT, J. & INVESTIGATORS, A. 2013. Granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute ischemic stroke: results of the AX200 for Ischemic Stroke trial. *Stroke*, 44, 2681-7.
- ROUSSELET, E., KRIZ, J. & SEIDAH, N. G. 2012. Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *J Vis Exp*.
- SACCO, R. L., KASNER, S. E., BRODERICK, J. P., CAPLAN, L. R., CONNORS, J. J., CULEBRAS, A., ELKIND, M. S., GEORGE, M. G., HAMDAN, A. D., HIGASHIDA, R. T., HOH, B. L., JANIS, L. S., KASE, C. S., KLEINDORFER, D. O., LEE, J. M., MOSELEY, M. E., PETERSON, E. D., TURAN, T. N., VALDERRAMA, A. L., VINTERS, H. V., AMERICAN HEART ASSOCIATION STROKE COUNCIL, C. O. C. S., ANESTHESIA, COUNCIL ON CARDIOVASCULAR, R., INTERVENTION, COUNCIL ON, C., STROKE, N., COUNCIL ON, E., PREVENTION, COUNCIL ON PERIPHERAL VASCULAR, D., COUNCIL ON NUTRITION, P. A. & METABOLISM 2013. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 44, 2064-89.

- SCHABITZ, W. R., KOLLMAR, R., SCHWANINGER, M., JUETTLER, E., BARDUTZKY, J., SCHOLZKE, M. N., SOMMER, C. & SCHWAB, S. 2003. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 34, 745-51.
- SCHABITZ, W. R., LAAGE, R., VOGT, G., KOCH, W., KOLLMAR, R., SCHWAB, S., SCHNEIDER, D., HAMANN, G. F., ROSENKRANZ, M., VELTKAMP, R., FIEBACH, J. B., HACKE, W., GROTTA, J. C., FISHER, M. & SCHNEIDER, A. 2010. AXIS: a trial of intravenous granulocyte colony-stimulating factor in acute ischemic stroke. *Stroke*, 41, 2545-51.
- SCHIEBLER, T. & KORF, H.-W. 2007. *Anatomie*, Frankfurt am Main, Steinkopff Verlag.
- SCHNEIDER, A., KRUGER, C., STEIGLEDER, T., WEBER, D., PITZER, C., LAAGE, R., ARONOWSKI, J., MAURER, M. H., GASSLER, N., MIER, W., HASSELBLATT, M., KOLLMAR, R., SCHWAB, S., SOMMER, C., BACH, A., KUHN, H. G. & SCHABITZ, W. R. 2005a. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest*, 115, 2083-98.
- SCHNEIDER, A., KUHN, H. G. & SCHABITZ, W. R. 2005b. A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle*, 4, 1753-7.
- SEHARA, Y., HAYASHI, T., DEGUCHI, K., ZHANG, H., TSUCHIYA, A., YAMASHITA, T., LUKIC, V., NAGAI, M., KAMIYA, T. & ABE, K. 2007. Decreased focal inflammatory response by G-CSF may improve stroke outcome after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Res*, 85, 2167-74.
- SEVIMLI, S., DIEDERICH, K., STRECKER, J. K., SCHILLING, M., KLOCKE, R., NIKOL, S., KIRSCH, F., SCHNEIDER, A. & SCHABITZ, W. R. 2009. Endogenous brain protection by granulocyte-colony stimulating factor after ischemic stroke. *Exp Neurol*, 217, 328-35.
- SHAH, K. K., BOREDDY, P. R. & ABBRUSCATO, T. J. 2015. Nicotine pre-exposure reduces stroke-induced glucose transporter-1 activity at the blood-brain barrier in mice. *Fluids Barriers CNS*, 12, 10.
- SHIMODA, K., OKAMURA, S., HARADA, N., KONDO, S., OKAMURA, T. & NIHO, Y. 1993. Identification of a functional receptor for granulocyte colony-stimulating factor on platelets. *J Clin Invest*, 91, 1310-3.
- SHYU, W. C., LIN, S. Z., YANG, H. I., TZENG, Y. S., PANG, C. Y., YEN, P. S. & LI, H. 2004. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation*, 110, 1847-54.
- SIEBLER, M., HENNERICI, M. G., SCHNEIDER, D., VON REUTERN, G. M., SEITZ, R. J., ROTHER, J., WITTE, O. W., HAMANN, G., JUNGHANS, U., VILLRINGER, A. & FIEBACH, J. B. 2011. Safety of Tirofiban in acute Ischemic Stroke: the SaTIS trial. *Stroke*, 42, 2388-92.
- SIX, I., GASAN, G., MURA, E. & BORDET, R. 2003. Beneficial effect of pharmacological mobilization of bone marrow in experimental cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol*, 458, 327-8.
- SMITH, W., HAUSER, S. & EASTON, J. 2005. CEREBROVASCULAR DISEASES. In: BRAUNWALD, E., HAUSER, S., FAUCI, A., LONGO, D., KASPER, D. & JAMESON, J. (eds.) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16 ed. New York: McGraw-Hill.
- SOLAROGLU, I., TSUBOKAWA, T., CAHILL, J. & ZHANG, J. H. 2006. Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience*, 143, 965-74.
- SOMMER, C. 2008. Ischemic preconditioning: postischemic structural changes in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67, 85-92.
- SOMMER, C., KOLLMAR, R., SCHWAB, S., KIESSLING, M. & SCHABITZ, W. R. 2003. Exogenous brain-derived neurotrophic factor prevents postischemic downregulation of [3H]muscimol binding to GABA(A) receptors in the cortical penumbra. *Brain Res Mol Brain Res*, 111, 24-30.
- SOMMER, C. J. 2017. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, 133, 245-261.
- STROKE THERAPY ACADEMIC INDUSTRY ROUNDTABLE 1999. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*, 30, 2752-8.
- SUTHERLAND, B. A., MINNERUP, J., BALAMI, J. S., ARBA, F., BUCHAN, A. M. & KLEINSCHNITZ, C. 2012. Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke*, 7, 407-18.
- SZENASI, G., VEGH, M., SZABO, G., KERTESZ, S., KAPUS, G., ALBERT, M., GREFF, Z., LING, I., BARKOCZY, J., SIMIG, G., SPEDDING, M. & HARSING, L. G., JR. 2008. 2,3-benzodiazepine-type AMPA receptor antagonists and their neuroprotective effects. *Neurochem Int*, 52, 166-83.
- TAKANO, T., TIAN, G. F., PENG, W., LOU, N., LOVATT, D., HANSEN, A. J., KASISCHKE, K. A. & NEDERGAARD, M. 2007. Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nat Neurosci*, 10, 754-62.

- TSAI, S. T., CHU, S. C., LIU, S. H., PANG, C. Y., HOU, T. W., LIN, S. Z. & CHEN, S. Y. 2017. Neuroprotection of Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Early Stage Parkinson's Disease. *Cell Transplant*, 26, 409-416.
- VELLENGA, E., RAMBALDI, A., ERNST, T. J., OSTAPOVICZ, D. & GRIFFIN, J. D. 1988. Independent regulation of M-CSF and G-CSF gene expression in human monocytes. *Blood*, 71, 1529-32.
- VIAENE, A. N., PETROF, I. & SHERMAN, S. M. 2011. Properties of the thalamic projection from the posterior medial nucleus to primary and secondary somatosensory cortices in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 18156-61.
- VOGEL, J., MOBIUS, C. & KUSCHINSKY, W. 1999. Early delineation of ischemic tissue in rat brain cryosections by high-contrast staining. *Stroke*, 30, 1134-41.
- WANG, G. H., JIANG, Z. L., FAN, X. J., ZHANG, L., LI, X. & KE, K. F. 2007. Neuroprotective effect of taurine against focal cerebral ischemia in rats possibly mediated by activation of both GABAA and glycine receptors. *Neuropharmacology*, 52, 1199-209.
- WARD, A. C. 2007. The role of the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSF-R) in disease. *Front Biosci*, 12, 608-18.
- WARDLAW, J., MURRAY, V., BERGE, E. & DEL ZOPPO GREGORY, J. 2009. Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Online].
- WATSON, C., PAXINOS, G. & PUELLES, L. 2011. *The Mouse Nervous System*, London, UK, Academic Press.
- WATSON, S. & CULLINAN, W. E. 2000. Cytology and Circuitry. In: DAVIS, K., CHARNEY, D. & COYLE, J. (eds.) *Neuropsychopharmacology - 5th Generation of Progress*. Philadelphia, USA: Lippincott, Williams, & Wilkins.
- WEI, G. & DORE, S. 2010. Importance of normothermia control in investigating delayed neuronal injury in a mouse global ischemia model. *J Neurosci Methods*, 185, 230-5.
- WIESER, M., BONIFER, R., OSTER, W., LINDEMANN, A., MERTELSMANN, R. & HERRMANN, F. 1989. Interleukin-4 induces secretion of CSF for granulocytes and CSF for macrophages by peripheral blood monocytes. *Blood*, 73, 1105-8.
- WOLFE, C. D. 2000. The impact of stroke. *Br Med Bull*, 56, 275-86.
- XING, C., ARAI, K., LO, E. H. & HOMMEL, M. 2012. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke*, 7, 378-85.
- YOUNG, W. S., 3RD & KUCHAR, M. J. 1979. A new method for receptor autoradiography: [³H]opioid receptors in rat brain. *Brain Res*, 179, 255-70.
- Z Aidat, O. O., BOZORGCHAMI, H., RIBO, M., SAVER, J. L., MATTLE, H. P., CHAPOT, R., NARATA, A. P., FRANCOIS, O., JADHAV, A. P., GROSSBERG, J. A., RIEDEL, C. H., TOMASELLO, A., CLARK, W. M., NORDMEYER, H., LIN, E., NOGUEIRA, R. G., YOO, A. J., JOVIN, T. G., SIDDIQUI, A. H., BERNARD, T., CLAFFEY, M. & ANDERSSON, T. 2018. Primary Results of the Multicenter ARISE II Study (Analysis of Revascularization in Ischemic Stroke With EmboTrap). *Stroke*.
- ZEIDLER, C., SCHWINZER, B. & WELTE, K. 2003. Congenital neutropenias. *Rev Clin Exp Hematol*, 7, 72-83.
- ZHOU, Y. & DANBOLT, N. C. 2014. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)*, 121, 799-817.
- ZILLES, K., PALOMERO-GALLAGHER, N. & SCHLEICHER, A. 2004. Transmitter receptors and functional anatomy of the cerebral cortex. *J Anat*, 205, 417-32.
- ZSEBO, K. M., YUSCHENKOFF, V. N., SCHIFFER, S., CHANG, D., MCCALL, E., DINARELLO, C. A., BROWN, M. A., ALTROCK, B. & BAGBY, G. C., JR. 1988. Vascular endothelial cells and granulopoiesis: interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. *Blood*, 71, 99-103.

Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Clemens Sommer, herzlich danken für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung auch über mehrere Ozeane und Kontinente hinweg und für die Möglichkeit, mich beim Verfassen unseres wissenschaftlichen Artikels einzubringen.

Auch meiner Betreuerin, Dr. med. Katrin Frauenknecht, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen. Sie stand bei allen Fragen und Problemen in der praktischen Phase stets kompetent und freundlich zur Verfügung und gab mir eine unschätzbar hilfreiche Einführung in die Auswertung der Rezeptorautoradiographien sowie die Durchführung der statistischen Analysen.

Der Münsteraner Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Jens Minnerup, Dr. rer. nat. Kai Diederich und Prof. Dr. med. Matthias Schilling möchte ich meinen Dank aussprechen für die Durchführung der Tierexperimente sowie die Beantwortung meiner Fragen zu Material und Methoden.

Bei Nicole Roder und Magdeleine Herkt möchte ich mich für die technische Expertise und die Durchführung der Gewebeverarbeitung und Silberfärbung bedanken, sowie bei Magdeleine Herkt für das Erstellen der Rezeptorautoradiographien.

Christina Grimm und Henrike Bauer möchte ich herzlich danken für die Bildanalysen der Silberfärbungen sowie für das Überlassen ihrer Rohdaten für meine Arbeit.

Meinem guten Freund David Schnurre danke ich herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Eltern, Hans und Christiane Mammele, die mich während meines Studiums in jeder Hinsicht bewundernswert unterstützt haben und diese Arbeit inhaltlich und formal Korrektur gelesen haben, gebührt mein herzlichster Dank.

Schließlich gebührt meiner Frau Rachel Seigneur mein tiefster Dank für ihre liebevolle Unterstützung und Motivation zum Fertigstellen dieser Arbeit sowie für ihr Verständnis für die vielen langen Tage und Semesterferien, die ich in diese Arbeit investiert habe.

Lebenslauf

(in Online-Version gelöscht)