

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie

(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Expression der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren- γ ,
des Tumornekrosefaktors- α und der Cyclooxygenase-2
im ischämischen Gehirngewebe nach fokalem Schlaganfall bei der Ratte
unter Vorbehandlung mit Pioglitazon**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

Andreas Patzer

aus Pforzheim

Kiel 2013

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Culmann, Institut für Experimentelle und
Klinische Pharmakologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Klettner, Klinik für Ophthalmologie

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 25.03.2014

Gez: Prof. Dr. Johann Roeder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1 Einleitung	1
1.1 Der Ischämische Schlaganfall	1
1.1.1 Epidemiologie und Therapieansätze	1
1.1.2 Pathogenese des ischämischen Schlaganfalles	2
1.1.2.1 Exzitotoxizität und Periinfarkt-Depolarisation	2
1.1.2.2 Postischämische Entzündungsreaktion	4
1.1.2.3 Apoptose nach einem Schlaganfall	4
1.1.2.4 Tumornekrosefaktor- α , Interleukin- 1β und Interleukin-6 im zentralen Nervensystem	5
1.2 Die Peroxysom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren und ihre Liganden	6
1.2.1 Aufbau und Funktion	6
1.2.2 Der Peroxysom-Proliferator-aktivierte Rezeptor gamma (PPAR- γ)	6
1.2.3 PPAR- γ im zentralen Nervensystem	7
1.3 Die Cyclooxygenasen	8
1.3.1 Die Rolle der Cyclooxygenasen im ZNS	9
1.4 Fragestellung	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Versuchstiere	12
2.2 Operationstechniken	12
2.2.1 Implantation osmotischer Minipumpen	12
2.2.2 Implantation des Femoraliskatheters für Blutentnahmen	13
2.2.3 Messung des regionalen zerebralen Blutflusses	13
2.2.4 Model der fokalen zerebralen Ischämie mit anschließender Reperfusion durch temporären Verschluss der rechten Arteria cerebri media (MCAO)	14
2.3 Quantifizierung des neurologischen Defizites	14

2.3.1 Bewertung des neurologischen Status nach Bederson et al. (1986)	15
2.3.2 Bewertung des neurologischen Status nach Garcia et al. (1995)	15
2.4 Ansetzen von Lösungen	17
2.5 Entnahme der Gehirne für die Bestimmung von Infarktgröße und immunhistochemische Analysen	19
2.6 Anfertigen der Gewebeschnitte	20
2.7 Bestimmung des Infarktvolumens	20
2.8 Nachweis von PPAR- γ , COX-1 und COX-2 mittels Immunhistochemie	21
2.9. Immunfluoreszenzfärbungen	22
2.10 Mikroskopie	23
2.11 Primäre Zellkulturen	23
2.12 Western-Blot-Analyse	23
2.12.1 Gewebeentnahme und Proteinisolierung	23
2.12.2 Messung des Proteingehaltes	24
2.12.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.12.4 Western-Blot	25
2.12.5 Stripping der Western-Blot Membran	26
2.13 Protokolle	26
2.13.1 Auswirkung der icv Behandlung mit Vehikel und Pioglitazon auf die physiologischen Blutparameter vor und nach der zerebralen Ischämie	26
2.13.2 PPAR- γ und COX-2 positive Zellen im frontoparietalen Kortex nach fokaler zerebraler Ischämie: Zeitverlauf	27
2.13.3 Effekte von Pioglitazon auf die Expression von TNF- α , COX-1, COX-2 und die Infarktgröße nach einer zerebralen Ischämie	27
2.13.4 PPAR- γ und COX-2 Expression in primären neuronalen Zellkulturen nach Induktion von oxidativem Stress	28
2.14 Statistische Analyse	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Regionaler zerebraler Blutfluss (rCBF)	30

3.2 Physiologische Parameter im Blut	31
3.3 Infarkt volumen, Hirnödeme und Gesamtsterblichkeit	32
3.4 Neurologischer Status	34
3.5 PPAR- γ positive Zellen im ischämischen frontoparietalen Kortex nach MCAO	36
3.6 TNF- α im ischämischen frontoparietalen Kortex nach MCAO	39
3.7 COX-2 und COX-1 im ischämischen frontoparietalen Kortex nach MCAO	40
3.7.1 Zeitverlauf der Akkumulation von COX-2 positiven Zellen	40
3.7.2 COX-2 Expression im Kortex und im Hippocampus	41
3.7.3 COX-2 und COX-1 positive Zellen im frontoparietalen Kortex nach einer zerebralen Ischämie	43
3.8 Primäre neuronale Zellkulturen	46
4 Diskussion	51
5 Zusammenfassung	58
6 Literaturverzeichnis	60
7 Veröffentlichungen	69
8 Danksagung	70
9 Lebenslauf	71

Abkürzungen

Acc	Arteria carotis externa
Ace	Arteria carotis externa
Aci	Arterie carotis interna
Acm	Arteria cerebri media
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-14-isoxalazoleprppionic-acid
ATP	Adenosintriphosphat
CBF	zerebraler Blutfluss
COX	Cyclooxygenase
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
icv	intrazerebroventrikulär
IL-1	Interleukin-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LDH	Lactatdehydrogenas
MCAO	middle cerebral artery occlusion- Okklusion der Arteria cerebri media
NeuN	neuronaies Kernprotein
NF- κ B	nuklearer Transkriptionsfaktor κ B
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
PPAR- γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ
rCBF	regionaler zerebraler Blutfluss
SDS	Sodium Dodecyl Sulphat
SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

1 Einleitung

1.1 Der ischämische Schlaganfall

1.1.1 Epidemiologie und Therapieansätze

Etwa 250.000 Menschen erleiden allein in Deutschland jährlich einen Schlaganfall. Damit zählt dieser nach kardiovaskulären und Krebserkrankungen mit 15% zu der dritthäufigsten Ursache aller Todesfälle und gehört zu den häufigsten Gründen für Invalidität im höheren Lebensalter. Zu den wesentlichen Risikofaktoren zählen ein arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, Nikotinkonsum, Alkoholkrankheit, kardiovaskuläre Vorerkrankungen sowie eine genetische Prädisposition. Ungefähr 85% der Ereignisse entfallen auf einen ischämischen Schlaganfall, welcher durch eine akute regionale Minderdurchblutung neuronalen Gewebes gekennzeichnet ist. Betroffen ist meist eine der größeren Arterien innerhalb des Gehirnes, wie beispielsweise die Arteria cerebri media (Acm). Ursache dieser regionalen Minderdurchblutung ist ein akuter Verschluss entweder durch ortsständiges thrombotisches Material oder einen verschleppten Thrombus (Dirnagl et al., 1999).

Die individuellen Auswirkungen nach einem Schlaganfall hängen von der Dauer des Verschlusses des jeweiligen Blutgefäßes und dessen Versorgungsgebiet ab. Symptome wie eine Hemiparese, Sehstörungen, oder auch Sprach-, Gedächtnis- und Sensibilitätsstörungen sind nur einige der Symptome, welche durchaus fluktuieren und über die Zeit zu- oder abnehmen können.

Auf den (teilweisen) Verschluss einer Gehirnarterie folgt eine Reihe biochemischer Reaktionen, welche innerhalb weniger Stunden zu einem irreversiblen Funktionsverlust neuronalen Gewebes führen. Zu den wichtigsten Mechanismen gehören die Exzitotoxizität, Depolarisationsvorgänge im Infarktgebiet und im umliegenden Gewebe (Penumbra), Entzündungsreaktionen und der programmierte Zelltod (Dirnagl et al., 1999).

Trotz zahlreicher Bemühungen sind die therapeutischen Maßnahmen nach einem ischämischen Schlaganfall nur begrenzt und ihre Ergebnisse oft nicht zufriedenstellend, was wiederum den Bedarf an alternativen Therapieoptionen unterstreicht.

Nach Ausschluss einer intrazerebralen Blutung und Diagnosesicherung besteht die kausale Therapie derzeit innerhalb eines Zeitfensters von 4,5 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome in einer intravenösen Lysetherapie mit dem Ziel, den gefäßverschließenden

Thrombus aufzulösen. Hierzu wird dem Patienten ein rekombinanter Gewebe-Plasminogen-Aktivator (rt-PA) verabreicht, um die Blutversorgung wiederherzustellen und die neurologischen Auswirkungen zu verringern.

Über diese Zeitspanne hinaus sind noch eine lokale intraarterielle thrombolytische Therapie mit pro-Urokinase sowie eine mechanische Rekanalisierung möglich.

Außer diesen spezifischen Behandlungsmethoden werden eine Aufrechterhaltung kardialer und respiratorischer Körperfunktionen zur Gewährleistung einer ausreichenden Oxygenierung arteriellen Blutes, der Ausgleich von evtl. auftretenden Verschiebungen im Elektrolythaushalt sowie die Behandlung der meist vorliegenden Erhöhung von Körpertemperatur und Blutglukosewerten durchgeführt. Darüber hinaus sind eine frühe Sekundärprophylaxe und die Einleitung rehabilitativer Maßnahmen wichtige Bestandteile in der Therapie des Schlaganfalles.

Neuroprotektiva versuchen an verschiedenen Stellen innerhalb der biochemischen Prozesse einzugreifen, um Depolarisations- und Entzündungsvorgänge anzuhalten, um damit die Größe des Infarktareals zu verringern und eine Verbesserung des neurologischen Status zu erzielen. Jedoch haben zahlreiche klinische Studien gezeigt, dass eine Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen nur sehr bedingt möglich ist.

1.1.2 Pathogenese des ischämischen Schlaganfalles

1.1.2.1 Exzitotoxizität und Periinfark-Depolarisation

Das Gehirn reagiert besonders empfindlich auf eine Unterbrechung des regionalen Blutflusses. Im Vergleich zu Herzmuskelzellen, die eine Ischämietoleranz von etwa 20-40 Minuten aufweisen, führt eine Minderperfusion im Gehirn bereits nach 5 Minuten zum Absterben von Neuronen (Lee et al., 2000). Von allen Organen des menschlichen Organismus entfallen 15% des Herzzeitvolumens allein auf das Gehirn und es verbraucht annähernd 25% des Grundumsatzes. Zur Energiegewinnung ist es auf Glucose und Sauerstoff angewiesen (Dirnagel et al, 1999).

Während eines ischämischen Schlaganfalls kommt es durch die Unterbrechung der Blutzufuhr nicht nur zu einem Verlust der lebenswichtigen Energiesubstrate. Vielmehr werden die neuronalen Zell-Zell Interaktionen und wichtige Signaltransduktionswege gestört und es kommt zur Produktion freier Radikale, zum Freiwerden katabolischer Enzyme, dem Zusammenbruch des Membranpotentials, zur Induktion von Entzündungsreaktionen und dem

programmierten neuronalen Zelltod. Das Ischämiegebiet lässt sich dabei in zwei Bereiche unterteilen: Den Ischämiekern, in dem die Durchblutung jenseits der Infarktschwelle liegt und dessen Zellen unwiderruflich innerhalb kurzer Zeit absterben und die Periinfarktzone (Penumbra), die zusätzlich über Kollateralen aus anderen Hirngefäßen versorgt wird. Hier wurde der Blutfluss nur partiell unterbrochen und die Energiegewinnung bleibt daher zunächst teilweise erhalten, wodurch die Neurone meist mehrere Stunden oder Tage überleben (Hossmann, 2006). Wegen des Mangels an Adenosintriphosphat (ATP) kommt es in der Frühphase zu einer Verringerung des Membranpotentials, Aktivierung der spannungsabhängigen präsynaptischen Calcium-Kanäle und zu einem massiven Ausströmen von Kaliumionen und zum Einstrom von Natrium und Kalziumionen sowie zur Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren und Glutamat in Neuronen. Aufgrund des Energiemangels können die freigesetzten exzitatorischen Neurotransmitter nicht mehr in die präsynaptischen Nervenendigungen aufgenommen werden. Die übermäßige Aktivierung von N-methyl-D-Aspartat (NMDA) und alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolpropionsäure (AMPA) Rezeptoren führt zu einem vermehrten Einstrom von Kalzium-, Natrium- und Chlorid-Ionen gefolgt von dem Einstrom von Flüssigkeit. Die Schwellung der neuronalen Zellen und Dendriten zeigt sich morphologisch als Hirnödem. Somit ist die Exzitotoxizität hauptsächlich auf diese Überstimulation von Glutamatrezeptoren und die daraus resultierenden biochemischen Prozesse zurückzuführen (Choi, 1996, Dirnagl et al., 1999).

Durch den intrazellulären Anstieg von Kalzium werden proteolytische Enzyme aktiviert, welche das Zytoskellest zerstören. Die Aktivierung von Phospholipase A₂ und Cyclooxygenasen führt zur Bildung freier Radikale, welche zur Schädigung von Zellmembranen führt. Die freien Sauerstoffradikale dienen auch als Signalmoleküle u.a. für die Vermittlung von Entzündungsreaktionen und des programmierten Zelltodes (Apoptose, s.u.).

In dem das ischämische Kerngebiet umgebenden Areal, der Penumbra sind die Zellen in der Frühphase noch in der Lage zu repolarisieren. Dieser Vorgang verbraucht jedoch Energie. Aufgrund der erhöhten Freisetzung von Glutamat und der erhöhten intrazellulären Konzentrationen von Kalziumionen kommt es zu wiederholten Depolarisationsvorgängen, den sogenannten Periinfarkt-Depolarisationen. Durch die gestörte Energiegewinnung und die Anhäufung toxischer Metabolite im Ischämiekern sterben innerhalb von Stunden die Neurone ab (Dirnagl et al., 1999; Lipton, 1999; Hossmann, 2006).

1.1.2.2 Postischämische Entzündungsreaktion

Während einer Ischämie kommt es zu einer Freisetzung und Expression verschiedenster Entzündungsmediatoren, wie Chemokine und Prostaglandine sowie zur Aktivierung von Immunzellen. Neurone, Astrozyten, Mikrogliazellen und Oligodendrozyten sind in der Lage, Entzündungsmediatoren zu produzieren. In diesen Zellen kommt es zu einer vermehrten Expression von Genen, welche inflammatorische Zytokine und Adhäsionsmoleküle kodieren. Hauptmerkmale der Entzündungsprozesse im ischämischen Gehirngewebe sind: Aktivierung von Mikrogliazellen, Ödembildung, Expression des MHC (major histocompatibility complex) Synthese von Entzündungsmediatoren, wie Zytokine, freie Radikale und Prostaglandine, Expression von Adhäsionsmolekülen und Invasion von Makrophagen sowie Leukozyten aus der Blutzirkulation ins ischämische Gehirngewebe. (Lucas et al., 2006)

1.1.2.3 Apoptose nach einem Schlaganfall

Die Art und Weise, wie Neurone nach einem ischämischen Insult untergehen, hängt von der Stärke und Dauer der Hypoxie und der damit verbundenen mangelnden Energiezufuhr ab. Ein abrupter und permanenter Gefäßverschluss führt zur Nekrose der betroffenen Neurone. Eine verminderte Blutzufuhr in der Penumbra löst Hypoxien unterschiedlichen Schweregrades aus, so dass die Zellen entweder überleben oder in die sog. Apoptose, den programmierten Zelltod, übergehen. Effektormoleküle der Apoptose sind die Proteasen aus der Familie der Caspasen. Bei dem extrinsischen Weg werden die apoptogenen Membranrezeptoren insbesondere durch Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder durch zelltodspezifische Liganden wie Fas-Liganden stimuliert und über die Aktivierung der Caspase 8 und Caspase 3 die Apoptose eingeleitet. Bei dem intrinsischen (mitochondrialen) apoptotischen Weg kommt es zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma. Der Weg kann durch die Stimulation der Expression von pro-apoptotisch wirkenden und die Unterdrückung der Expression von anti-apoptotisch wirkenden Mitgliedern der Bcl-2 Familie ausgelöst werden. Dies führt zur Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren – wie etwa Cytochrom c – aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Die Aktivierung von Caspasen bewirkt die Kondensation und Fragmentierung der DNA (Mattson et al., 2000).

1.1.2.4 Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β und Interleukin-6 im zentralen Nervensystem

Der TNF- α gehört zur Gruppe der Zytokine, welche als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren verschiedenste Signale vermitteln und beispielsweise bei Entzündungsreaktionen, Zellproliferation, Organogenese und beim Zelltod durch Apoptose beteiligt sind. TNF- α wird hauptsächlich in Makrophagen gebildet, jedoch auch eine große Anzahl anderer Zellen, wie z. B. Lymphozyten, Mikrogliazellen und beschädigte Neurone setzen TNF- α frei. TNF- α aktiviert zwei spezifische Rezeptoren: den TNF-Rezeptor-1 (TNF-R1, auch p55 genannt) und den TNF-Rezeptor-2 (TNF-R2, auch p75 genannt). Der größte Teil der TNF-Aktivität wird jedoch über TNF-R1 übermittelt. Durch die Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren werden die Proteinkinase C, die Tyrosinkinase, die mitogen-aktivierte Proteinkinase, die Phospholipase A2 und Transkriptionsfaktoren, wie der nukleäre Transkriptionsfaktor κ B (NF- κ B), aktiviert. Der NF- κ B bindet im Zellkern an den Promoter verschiedener Gene und erhöht die Expression von Adhäsionsmolekülen und anderer Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6). TNF- α ist aber auch an der Regulation der Zelldifferenzierung, Zytokinproduktion und Hemmung des programmierten Zelltodes beteiligt. Eine Infektion, Gehirnverletzung oder Ischämie erhöht die Produktion von TNF- α im ZNS (Liu et al., 1994). Die Konzentration von TNF- α mRNA steigt sehr schnell nach einer Ischämie an. Schon nach einer Stunde ist die vermehrte TNF- α mRNA Expression in Rattengehirnen nachweisbar. Das Maximum ist nach etwa 6-12 h erreicht und die Werte für die Konzentration von TNF- α mRNA bleiben noch 2-5 Tage nach einer Ischämie erhöht (Liu et al., 1994). Der TNF- α kann nach einem Schlaganfall sowohl schädliche als auch protektive Effekte vermitteln. Zum einen aktiviert TNF- α den Rezeptor p75, über den bislang nur wenig bekannt ist, und zum anderen führt eine Bindung an den Rezeptor p55 zur Apoptose geschädigter Neurone.

Das IL-1 weist eine Reihe neurotoxischer Effekte auf. Die am besten erforschten Formen des IL-1 stellen das IL-1 α und das IL-1 β dar (Rothwell and Luheshi, 2000). IL-1 vermittelt seine Effekte hauptsächlich durch die Aktivierung des IL-1 Typ I Rezeptors. Nach Freisetzung von IL-1 durch aktivierte Mikrogliazellen kommt es zu einer Kaskade verschiedener Freisetzung- und Modulationsvorgänge. So werden Wachstumsfaktoren induziert und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) aktiviert, welche für die erhöhte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) verantwortlich ist.

IL-6 vermittelt über den IL-6 Rezeptor zahlreiche Effekte und beeinflusst ebenfalls die

Produktion von Zytokinen. Die Fähigkeit, IL-6 zu induzieren wird verschiedenen Zellen des ZNS zugeschrieben. Hierbei zeigt sich auch das komplexe Zusammenwirken der einzelnen Mediatoren im Bezug auf ihre Fähigkeit Zytokine zu induzieren. So stimuliert beispielsweise TNF- α die Expression von IL-1 und IL-6, wobei IL-1 wiederum selbst einen Anstieg von IL-6 und TNF- α bewirkt.

1.2 Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren und ihre Liganden

1.2.1 Aufbau und Funktion

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind intrazelluläre nukleare Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren fungieren und nach Bindung eines Liganden die Gentranskription aktivieren oder inhibieren. PPARs binden dazu an eine spezifische DNA-Sequenz, das *PPAR response element* (PPRE). Um an dieser Zielsequenz der DNA binden zu können, muss der PPAR einen Komplex mit dem Retinoid X, dem Rezeptor der 9-cis Retinoidsäure bilden.

Drei Subtypen der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren sind bekannt:

Der PPAR- α findet sich in Leber, Fettgewebe, Niere sowie der Herz- und Skelettmuskulatur. Synthetische Liganden für den PPAR- α sind die Lipidsenker aus der Gruppe der Fibrate. PPAR- δ auch als PPAR- β bezeichnet wird in allen Geweben exprimiert und reguliert Gene des basalen Glukose- und Fettstoffwechsels (Desvergne and Wahli, 1999). Der PPAR- γ kommt hauptsächlich im Fettgewebe vor und bewirkt eine vermehrte Expression von Glukosetransportern und damit eine verstärkte Aufnahme von Glukose in die Zelle. In der Leber verringert er die Glukoneogenese und erhöht die Glykolyse. An den PPAR- γ binden die sog. Insulinsensitizer, welche zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt werden (vgl. auch 1.2.2). Zwei Isoformen des PPAR- γ wurden beschrieben: PPAR- γ 1 und PPAR- γ 2. PPAR- γ 1 findet sich v.a. in braunem und weißem Fettgewebe und ist dort für Vorgänge im Glukosestoffwechsel verantwortlich, wohingegen PPAR- γ 2 auch im ZNS, dem Darm und manchen Entzündungszellen nachgewiesen wurde (Staels and Fruchart, 2005).

1.2.2 Der Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (PPAR- γ)

Die natürlicherweise im Organismus vorkommenden Agonisten am PPAR sind langkettige Fettsäuren und Eicosanoide (Derivate der Arachidonsäure) wie das 15-Deoxy- Δ 12,14-

Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂). In der Therapie des Diabetes mellitus Typ II werden Thiazolidindione, welche auch als Glitazone bezeichnet werden als selektive Agonisten am PPAR- γ eingesetzt (Staels and Fruchart, 2005). Zugelassen für die Therapie des Diabetes mellitus Typ II ist nur das Pioglitazon. Auch nichtsteroidale Antiphlogistika wie das Ibuprofen zeigen eine gewisse agonistische Wirkung am PPAR- γ (Desvergne and Wahli, 1999).

Glitazone wirken durch eine Verstärkung der intrazellulären Insulinwirkung der mit Diabetes mellitus Typ 2 verbundenen Insulinresistenz entgegen. Angriffspunkt ist der intrazellulär lokalisierte PPAR- γ , dessen Aktivierung zu einer Transkription von Genen führt, die an der Differenzierung von Präadipozyten und an der insulinvermittelten Glucose-Aufnahme peripherer Gewebe beteiligt sind. Die Expression des insulinabhängigen Glucose-Transporters GLUT-4 wird erhöht und auch die Expression und Translokation des insulinunabhängigen Transporters GLUT-1 wird gesteigert. Die Expression von Leptin, TNF- α , Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und anderer Zytokine und Mediatoren aus Fettzellen wird reduziert.

1.2.3 PPAR- γ im zentralen Nervensystem

PPAR- γ konnte im zentralen Nervensystem (ZNS) hauptsächlich in Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen nachgewiesen werden. Sowohl unter normalen, als auch unter pathologischen Bedingungen (akut und chronisch degenerativen ZNS Erkrankungen) kommt es zu einer veränderten Expression von PPAR- γ (Bordet et al., 2006). Eine Aktivierung von PPAR- γ in Makrophagen führt zu einer verminderten Expression von TNF- α und iNOS, was die Entzündungsreaktionen und den Zelltod bei an Alzheimer erkrankten Patienten verringert (Feinstein et al., 2003). Eine Behandlung mit Thiazolidindionen zeigte in Studien auch einen positiven Effekt bei der Behandlung des M. Parkinson (Breidert et al., 2002). Die PPAR- γ -Expression im Gehirn ist auch bei fokaler zerebraler Ischämie erhöht. Die Aktivierung von PPAR- γ vermindert das Schlaganfallvolumen und die neurologischen Schäden bei fokaler zerebraler Ischämie (Zhao et al., 2005; Ou et al., 2006). Die Aktivierung von PPAR- γ verringert den oxidativen Stress im ischämischen Bereich über eine Hemmung der Expression von iNOS und der Matrix-Metalloproteinase -9 (MMP-9). Gleichzeitig wird die zytoprotektive Hemoxygenase-1 heraufreguliert (Pereira et al., 2005). Außerdem wurden erhöhte Spiegel des antioxidativen Enzyms CuZn-Superoxiddismutase gefunden (Shimazu et al., 2005). Zu den antiinflammatorischen Effekten des aktivierten PPAR- γ zählen die

Reduktion der Induktion von inflammatorischen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, ICAM-1 und der MMP-9. Durch die Hemmung der Entzündungsfaktoren und die Verminderung von oxidativem Stress vermindern die Liganden des PPAR- γ die neuronalen postischämischen Defekte (Heneka et al., 1999). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PPAR- γ -Agonisten neuronale Schädigungen verringern durch eine Reduktion des oxidativen Stresses und eine teilweise Hemmung der begleiteten Entzündungsreaktion.

1.3 Die Cyclooxygenasen

Zwei Isoformen der Cyclooxygenase, die Cyclooxygenase 1 (COX-1) und die Cyclooxygenase 2 (COX-2) wurden beschrieben. Der COX-2 kommt die entscheidende Rolle in der Vermittlung von Entzündungsreaktionen zu. Freie Radikale, die bei der enzymatischen Aktivität entstehen, vermögen, Lipide, die DNA und Proteine zu schädigen und leisten dadurch einen Beitrag zur Zerstörung neuronalen Gewebes. Im Speziellen wird dies durch Stickstoffmonoxid generiert, welches in Gliazellen mittels iNOS gebildet wird. Neben COX-1 und COX-2 wurde auch die Existenz von COX-3 postuliert, die eine Variante der COX-1 darstellt (Chandrasekharan et al. 2002).

Zwei benachbarte, aber räumlich getrennte aktive Zentren vermitteln die Cyclooxygenase - und die Peroxidaseaktivität. Verglichen mit der COX-1 verfügt die COX-2 über ein größeres aktives Zentrum. Dieser Unterschied könnte die Substrat-Vielfalt dieses Isoenzym und die geringere relative Affinität von nicht-selektiven Antiphlogistika für die COX-2 erklären. In vitro zeigte sich nämlich, dass die COX-2 eine größere Vielfalt von Fettsäuren oxydieren kann. Die COX-Isoenzyme sind auf der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums und der nukleären Membran lokalisiert. Sie befinden sich nur in einer Schicht der Lipiddoppelmembran und sind somit Membranproteine.

Unterschiede zwischen den COX-Isoenzymen bestehen nicht nur in ihrer Struktur, sondern auch in ihrer Expression und der Funktion. Im Gegensatz zur COX-1 wird die COX-2 in normalem Gewebe nicht exprimiert, sondern nur unter bestimmten Bedingungen induziert. Dies geschieht vor allem im Rahmen von Entzündungsreaktionen, in denen die COX-2 zur Bildung von Prostaglandinen führt, die als Regulatoren der akuten und chronischen Immunantwort, Schmerzvermittlung und Wundheilung dienen. Daneben ist die COX-2 auch an anderen Prozessen beteiligt, z.B. an der Regulation zentralnervöser Funktionen wie Fieber, Schmerzrezeption und lokalen inflammatorischen Reaktionen. Die COX-2 spielt auch eine

Rolle in der Regulation des Elektrolyt- und Wasser-Haushalts. Eine bakterielle Infektion und Entzündung im Magen erhöhen die COX-2- Expression und Prostaglandin-Synthese, die zur vermehrten Schleimbildung und Angiogenese im Sinne einer Wundheilung führt.

Die Expression von COX wird auf der transkriptionalen und translationalen Ebene reguliert. Die COX-1 wird in ruhenden Zellen und während der Zelldifferenzierung induziert. Im Gegensatz dazu besitzt das COX-2-Gen eine TATA-Box, eine AT-reiche Region, deren Bindung von Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B zur Transkription des Gens führt. Zu den Regulatoren der COX-2 Expression gehören zahlreiche Wachstumsfaktoren wie der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF), Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α und andere proinflammatorische Faktoren. Zu den weiteren Faktoren, die durch Bindung an die Promotorregion die Transkription von COX-2 induzieren, gehören eine Reihe von Onkogenen (Turini and DuBois, 2002).

1.3.1 Rolle der Cyclooxygenasen im ZNS

Beide Isoenzyme der Cyclooxygenase lassen sich im Gehirn nachweisen. Die COX-1 wird hauptsächlich in Makrophagen und Mikroglia exprimiert. Die COX-2 ist überwiegend in Neuronen zu finden und spielt eine entscheidende Rolle beim neuronalen Zelltod (Graham and Hickey, 2003). Bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen wie bei dem Schlaganfall, der Epilepsie und der Alzheimer Erkrankung konnte eine erhöhte COX-2 Expression nachgewiesen werden. Nach einer zerebralen Ischämie wird COX-2 vermehrt in Neuronen induziert. Die gebildeten Superoxidradikale schädigen entweder direkt das Gewebe oder nach der Reaktion mit Stickstoffmonoxid, wodurch Peroxynitrite entstehen, die für weitere Gewebeschäden verantwortlich sind. Aus der Arachidonsäure wird das Prostaglandin E₂ gebildet, welches die Glutamatfreisetzung erhöht (Iadecola et al., 2001). Eine übermäßige Aktivierung von NMDA-Rezeptoren führt zu einem vermehrten Einstrom von Kalzium-, Natrium- und Chloridionen sowie von Wasser in die Zelle. Das Membranpotential bricht zusammen und die Zellen schwellen an (vgl. 1.1.2.1). Bei COX-2 knock-out Mäusen kommt es nach einer zerebralen Ischämie zu einer deutlich weniger ausgeprägten neuronalen Zellschädigung (Iadecola et al., 2001). Neben einer Abnahme des Prostaglandin E₂ und einer verringerten Aktivität der Glutamat-Rezeptoren in Gewebeschnitten zeigte sich eine signifikant geringere Infarktgröße.

1.4 Fragestellung

Neben Depolarisationsvorgängen, der Freisetzung katabolischer Enzyme, der gestörten Signaltransduktion, dem Zusammenbruch des Membranpotentials und der Freisetzung von Radikalen spielen v.a. auch Entzündungsprozesse eine entscheidende Rolle bei dem Untergang von Neuronen im ischämischen Gewebe (Bordet et al., 2006; Culman et al., 2007). Der TNF- α ist neben dem Interleukin-1 β und Interleukin-6 einer der wichtigsten Mediatoren der post-ischämischen Inflammation. Der TNF- α wird im ischämischen neuronalen Gewebe vermehrt exprimiert. Über die Bindung an seine Rezeptoren induziert der TNF- α die Transkription zahlreicher inflammatorischer Mediatoren, Enzyme und zytotoxischer Stoffe. Eines der Schlüsselenzyme, die eine bedeutende Rolle bei den Entzündungsprozessen spielen, ist die COX-2. Nach der zerebralen Ischämie werden Cyclooxygenasen, hauptsächlich COX-2 vermehrt im ischämischen neuronalen Gewebe induziert und aktiviert. Die durch die enzymatische Aktivität gebildeten Superoxidradikale sind für den fortschreitenden neuronalen Zelltod verantwortlich. Eine veränderte Expression von PPAR- γ , TNF- α und COX-2 kann zu den neuroprotektiven Effekten von Pioglitazon nach einem ischämischen Schlaganfall beitragen. In dieser Arbeit wurde deshalb die Auswirkung des PPAR- γ – Agonisten Pioglitazon auf die Expression von PPAR- γ und die Induktion von TNF- α , COX-1 und COX-2 im ischämischen kortikalen Gewebe nach einer Okklusion der Arteria cerebri media (Acm) untersucht.

Um eine Stimulation ausschließlich der zentralen PPAR- γ zu erzielen, wurde Pioglitazon mittels osmotischer Minipumpen intracerebroventrikulär (icv) über einen Zeitraum von fünf Tagen vor der Induktion der Gehirnischämie infundiert. Die Kontrollgruppe wurde icv mit Vehikel behandelt. Zur Induktion der fokalen zerebralen Ischämie wurde die rechte Acm für 90 min verschlossen und danach wiedereröffnet. Während dieser Zeit wurde kontinuierlich der regionale zerebrale Blutfluss mittels Laser-Doppler Flowmetry gemessen. Bei einer mit Vehikel – und einer mit Pioglitazon – behandelten Gruppe wurden die physiologischen Parameter im Blut vor- während- und nach dem Verschluss der Acm ((middle cerebral artery occlusion (MCAO)) bestimmt. Die neurologische Untersuchung zur Ermittlung des neurologischen Defizites erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Bei Vehikel-behandelten Tieren wurde der Zeitverlauf der PPAR- γ und COX-2 Expression im frontoparietalen Kortex am Rand des Ischämiekerns nach fokaler zerebraler Ischämie untersucht. In diesem Gebiet wurde bei den mit Vehikel- und Pioglitazon behandelten Ratten auch die Expression von TNF- α und COX-2 mittels Western-blot Analyse quantifiziert und

die Anzahl der Zellen, welche das Zytokin, COX-1 und COX-2 exprimieren, bestimmt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen identifiziert, welche PPAR- γ und COX-2 exprimieren. Die Induktion von COX-2 wurde auch in dem ipsilateralen und kontralateralen Hippocampus untersucht. In primären kortikalen Zellkulturen wurden Effekte einer PPAR- γ Aktivierung auf die Induktion von COX-2 in Neuronen untersucht, die oxidativem Stress (Inkubation mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2)) ausgesetzt wurden. Zur Untersuchung der Bedeutung von PPAR- γ wurden die primären Neurone mit Pioglitazon allein oder mit einem Gemisch aus Pioglitazon und dem selektiven PPAR- γ - Antagonisten GW 9662 vor der H_2O_2 Zugabe vorbehandelt. Mittels Western-Blot Analyse und Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Expression von COX-2 erfasst.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 220 bis 250 g verwendet (Zucht des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, oder Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden bei kontrollierten Bedingungen bezüglich der Temperatur (25° C), der Luftfeuchtigkeit (60 %) und des Tag-Nacht-Rhythmus (12/12 h) gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Für die Gewinnung neuronaler Zellkulturen wurden neugeborene Ratten bis zu 24 Stunden nach der Geburt verwendet.

2.2 Operationstechniken

Alle Operationseingriffe wurden unter einer Chloralhydrat-Anästhesie (400 mg/kg KG, intraperitoneal) durchgeführt (4% Chloralhydrat-Lösung: 4 g Chloralhydrat (Merck, Darmstadt) wurden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst).

2.2.1 Implantation osmotischer Minipumpen

Die verwendeten osmotischen Minipumpen (ALZET®, Model 2002: Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) können gelöste Substanzen kontinuierlich bis zu 14 Tage mit einer Geschwindigkeit von 0,5µl/h in das gewünschte Gewebe abgeben. Die Minipumpen wurden mit einer 6 mM Lösung Pioglitazon (Cayman, Ann Arbor, Mi, USA) oder mit Vehikel-Lösung (50 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in physiologischer Kochsalzlösung) gefüllt. Pioglitazon wurde in einer Konzentration von 3 nmol/h icv infundiert.

Die osmotischen Minipumpen wurden mit einem Polyethylenkatheter (PP-60) versehen, an dem eine rechtwinklige Metallkanüle der Größe 21 Gauge befestigt war, welche dann später in den linken Ventrikel des Tieres eingebracht wurde. Danach wurden die Minipumpen für 24 Stunden in einer sterilen 0,9% igen Kochsalzlösung inkubiert, damit sich ein Diffusionsgleichgewicht einstellen konnte.

Die Implantation der osmotischen Minipumpen erfolgte fünf Tage vor Induktion der zerebralen Ischämie. Der Kopf des narkotisiertes Tieres wurde in ein stereotaktisches Gerät (Kopf Instruments, Tujunga, Kalifornien, USA) eingespannt und der Schädel mit einer

medialen Inzision freigelegt Der Schnitt wurde mit einem Wattestäbchen stumpf nach lateral erweitert. Ein Loch (Koordinaten: 0,6 mm kaudal vom Bregma ((Kreuzungsstelle der Sutura coronalis mit der Sutura sagittalis)) wurde durch die Schädeldecke bis auf die Dura mater gebohrt und diese dann mit einer dünnen Kanüle vorsichtig durchstoßen. Die rechtwinklige Kanüle wurde 5 mm tief in den Ventrikel eingebracht und mit Zahnzement fixiert. Die osmotische Minipumpe wurde in eine subkutane Tasche zwischen den Schulterblättern implantiert.

2.2.2 Implantation des Femoraliskatheters für Blutentnahmen

Bei narkotisierten Ratten wurde die rechte Leiste rasiert und durch einen Schnitt parallel zur Inguinalfalte die Haut durchtrennt. Das subkutane Fettgewebe und die Muskelfaszien wurden stumpf zur Seite präpariert, um die Arteria femoralis darzustellen. Über eine Inzision in das Gefäß mittels einer mikrochirurgischen Schere wurde ein Polyethylenkatheter (PP-50) dann 3 cm weit bis in die Aorta abdominalis vorgeschoben. Der Katheter wurde mit einer Kochsalz-Heparin-Lösung gefüllt und über einen subkutanen Tunnel am Nacken des Tieres herausgeführt, verschlossen und fixiert und die Wunde wurde vernäht.

2.2.3 Messung des regionalen zerebralen Blutflusses

Zur Detektion einer erfolgreich induzierten zerebralen Ischämie wurde der regionale zerebrale Blutfluss im Versorgungsgebiet der rechten Arteria cerebri media mithilfe des Periflux 5000 Gerätes der Firma Perimed (Järfälla, Schweden) gemessen. Ein Laser-Doppler-Fluss-Detektor wurde über eine Hülse, welche als Führungshilfe diente, bis an die Dura mater der rechten Hirnhemisphäre geführt. Diese Halterung wurde gemeinsam mit den osmotischen Minipumpen implantiert. Fünf mm lateral der Mittellinie und 1 mm kaudal vom Bregma auf der rechten Seite des Schädels wurde hierzu die Schädelkalotte mit einem Handbohrer (Durchmesser 1 mm) oberflächlich angebohrt, so dass die Dura mater noch intakt blieb. Eine Plastikhülse mit einem Innendurchmesser von 1 mm und einem Außendurchmesser von 2 mm wurde an dieser Stelle mit Zahnzement fixiert. Der regionale Blutfluss wurde zu Beginn und während des Schlaganfalls (30, 60 und 90 min nach dem Eintritt der zerebralen Ischämie) sowie 30 min nach dem Beginn der Reperfusion-Phase gemessen.

2.2.4 Model der fokalen zerebralen Ischämie mit anschließender Reperfusion durch temporären Verschluss der rechten Arteria cerebri media (MCAO)

Nach der Anästhesie wurden durch einen ca. 2 cm langen medialen Hautschnitt am Hals der Ratten unter dem Operationsmikroskop (Leica M3Z, Leica Mikrosysteme, Wetzlar) die Arteria carotis communis (Acc) und die Nerven auf der rechten Seite vom umliegenden Gewebe freigelegt. Die Acc teilt sich in ihrem Verlauf in die Arteria carotis externa (Ace) und die Arteria carotis interna (Aci). Die Arteria carotis externa wurde an ihrem Abgang mit einer 4-0 Naht ligiert. Die Aci wurde bis zum Eintritt in den Karotiskanal freigelegt und anschließend die Acc ligiert. Die partielle Abnahme des regionalen Blutflusses induzierte wegen der vorhandenen kollateralen Blutversorgung keinen Schlaganfall. Über eine kleine Inzision in die Acc konnte ein Faden durch die Aci bis zur Acm vorgeschoben werden. Der Faden (4/0, 1,5, Metrik, Monofilament, Ethilon, Ethicon GmbH & Co. KG, Deutschland) wurde zuvor an seinem distalen Ende mit einer Silikonschicht überzogen, um den Durchmesser des Fadens auf 0,25 mm zu erhöhen. Der Silikonfaden wurde so weit vorgeschoben, bis der zerebrale Blutfluss im frontoparietalen Kortex auf einen Wert unter 25 % des Ausgangswertes sank (ca. 17 mm). Der Silikonfaden wurde dann durch eine Ligatur an der Acc fixiert und für 90 Minuten im Gefäß belassen. Tiere, bei denen der zerebrale Blutfluss nicht unter 25 % des Ausgangswertes gesunken war, wurden nicht in die Versuchsreihe aufgenommen. Nach 90 Minuten Okklusion wurde der Silikonfaden vorsichtig entfernt und der Blutaustritt aus der Acc durch eine Ligatur unter- und oberhalb der Inzision gestoppt. Die Wunde im Bereich des Halses wurde mit einer Hautnaht verschlossen. Die Körpertemperatur der Ratten wurde mithilfe einer Heizdecke konstant auf 37 °C gehalten.

Bei *sham* – operierten Tieren wurde kein Verschluss der Acm herbeigeführt. Die Ratten wurden narkotisiert, die Acc wurde frei präpariert und ligiert. Auch bei diesen Tieren wurde der regionale Blutfluss im Versorgungsgebiet der rechten Arteria cerebri media gemessen und die Wunde nach 90 Minuten verschlossen. Diese Ratten dienten als Kontrollgruppe.

2.3 Quantifizierung des neurologischen Defizits

Die neurologische Untersuchung der Tiere wurde jeweils 24 und 48 Stunden nach dem Schlaganfall von einem Mitarbeiter vorgenommen, der keine Kenntnis darüber hatte, mit welcher Substanz das jeweilige Tier behandelt wurde. Diese Untersuchungen erfolgten nach zwei unterschiedlichen Methoden (Bederson et al. 1986; Garcia et al. 1995).

2.3.1 Bewertung des neurologischen Status nach Bederson et al. (1986)

Diese Methodik beruht auf der Beurteilung von drei Tests: 1. Beugung der oberen Extremität, 2. Verhalten des Tieres bei Ausüben von leichtem seitlichem Druck gegen beide Flanken des Tieres und 3. Bewegung des Tieres im freien Raum. Diese drei Aspekte wurden in dieser Reihenfolge an den Ratten getestet und eine Verteilung von 0 bis 3 Punkten zur Bewertung des neurologischen Defizits vorgenommen. Null Punkte bedeuten kein und 3 Punkte ein starkes neurologisches Defizit.

Zunächst wurden die Ratten am Schwanz in einem Meter Höhe in die Luft gehalten und die Reaktion der Vordergliedmaßen beobachtet. Gesunde Tiere strecken beide Pfoten gleichmäßig in Richtung des Bodens aus. Kam es zu einer Beugebewegung auf der kontralateralen Seite der vom Schlaganfall betroffenen Hemisphäre, so zeigte dies ein neurologisches Defizit an. Im nächsten Schritt wurde die Ratte auf einen Plastikuntergrund gesetzt und am Schwanz festgehalten. Sodann wurde von beiden Seiten mehrmals ein leichter Druck auf die Flanken des Tieres ausgeübt. Tiere ohne neurologisches Defizit setzten diesem Druck einen Widerstand entgegen. Beeinträchtigte Tiere hingegen ließen sich problemlos seitlich wegschieben. Zuletzt wurde beobachtet, wie das Tier sich verhält, wenn man es frei laufen ließ. Kreisende Bewegungen in Richtung der paretischen Seite entsprachen einem hohen neurologischen Defizit. Eine Beugebewegung der Vordergliedmaße wurde bei Ratten mit verminderter Resistenz auf lateralen Druck beobachtet. Beides, eine Beugung der Vordergliedmaße und eine verminderte Resistenz auf lateralen Druck wurden immer bei Ratten gesehen, welche kreisende Bewegungen zeigten.

2.3.2 Bewertung des neurologischen Status nach Garcia et al. (1995)

Diese Methodik ermöglicht eine Differenzierung zwischen der motorischen und sensorischen Beeinträchtigung der Tiere. Insgesamt wurden sechs Untersuchungen durchgeführt. Die Bewertung mit 0 bzw. 1 Punkt in drei Untersuchungen bedeutete eine starke Beeinträchtigung, 3 Punkte wurden bei nicht erkennbarem Defizit vergeben. Eine Gesamtpunktzahl von 3 Punkten in allen Untersuchungen entsprach einem starken neurologischen Defizit, eine Höchstpunktzahl von 18 Punkten wurde bei nicht beeinträchtigten, z. B. Kontrolltieren vergeben.

Folgende neurologische Untersuchungen wurden quantifiziert:

1. Spontane Aktivität

Der Käfig mit der Ratte wurde in einen ruhigen Raum gestellt und das Verhalten des Tieres nach Abnahme des Deckels für fünf Minuten beobachtet.

0 Punkte: Die Ratte bewegte sich gar nicht, sie war sehr stark beeinträchtigt

1 Punkt: Die Ratte bewegte sich kaum, da sie stark beeinträchtigt war

2 Punkte: Die Ratte bewegte sich, aber näherte sich nicht allen Seiten des Käfigs.

3 Punkte: Die Ratte erkundete ihre Umgebung, wobei sie mindestens drei Wände berührte.

2. Symmetrie der Bewegung aller vier Gliedmaßen

Für diesen Test wurde die Ratte an ihrem Schwanz in die Luft gehoben. Dabei wurden die Bewegungen (Ausstrecken) ihrer Extremitäten (hauptsächlich der Vorderpfoten) beobachtet.

0 Punkte: Die linken Gliedmaßen zeigten keine Bewegungen.

1 Punkt: Die linken Gliedmaßen bewegten sich minimal.

2 Punkte: Die linken Gliedmaßen bewegten sich wenig und langsamer als die Extremitäten der rechten Seite.

3 Punkte: Alle vier Gliedmaßen bewegten sich symmetrisch

3. Ausstrecken der Vorderpfoten

Das Tier wurde nun am Schwanz so weit hochgehoben, dass die Vorderpfoten den Boden noch berühren konnten. Man beobachtete, wie die Ratte auf seinen Vorderpfoten gehen konnte und wie symmetrisch sie diese ausstreckte.

0 Punkte: Die Ratte konnte die linke Vorderpfote nicht ausstrecken.

1 Punkt: Die Ratte konnte die linke Vorderpfote nur minimal ausstrecken.

2 Punkte: Die linke Vorderpfote wurde weniger ausgestreckt als die rechte, der Gang war ungleich.

3 Punkte: Die Ratte konnte beide Vorderpfoten gleichmäßig ausstrecken und normal gehen.

4. Klettern

Bei diesem Versuch wurde die Ratte auf das Gitter des Käfigs gesetzt und ihr Kletterverhalten bewertet.

1 Punkt: Die Ratte konnte nicht klettern oder sie bewegte sich im Kreis.

2 Punkte: Sie kletterte vorwiegend mit den rechten Gliedmaßen, da die linken Pfoten nicht so gut greifen konnten. Das Klettern war erschwert.

3 Punkte: Für die Ratte war das Klettern am Gitter problemlos möglich.

5. Propriozeption des Körpers

Die Ratte wurde mit einem Holzstäbchen auf der linken Seite des Körpers berührt und die Reaktion wurde mit derjenigen auf der rechten Körperseite verglichen.

1 Punkt: Die Ratte reagierte überhaupt nicht auf den Stimulus.

2 Punkte: Die Ratte reagierte auf der linken Seite schwächer und verzögert.

3 Punkte: Es kam beidseits zu der gleichen Reaktion bei der Berührung.

6. Reaktion bei Berührung der Tasthaare

Die Tasthaare wurden rechts- und linksseitig mit einem Holzstäbchen berührt. Das Stäbchen musste sich von hinten nähern, da die Ratte ansonsten auf den optischen Reiz reagierte.

1 Punkt: Auf der linken Körperseite kam es zu keiner Reaktion.

2 Punkte: Der Reiz führte auf der linken Seite zu einer schwächeren und verlangsamten Kopfdrehung und Bewegung.

3 Punkte: Auf beiden Seiten wurde aufgrund des Stimulus die gleiche Bewegung des Kopfes ausgelöst.

2.4 Ansetzen von Lösungen

Phosphatpuffer (PB) pH 7,4: 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 und 2 g KCl wurden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst, dann der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und schließlich mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

10 x PBS Kochsalzlösung gepuffert mit Phosphat (PBS) pH 7,4: 80 g NaCl, 11,5 g Na_2HPO_4 , 2 g KH_2PO_4 und 2 g KCl wurden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst, dann der pH-Wert mit NaOH und HCl auf 7,4 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Als Arbeitslösung wurde eine 1:10 Verdünnung der Lösung verwendet (1 x PBS).

PBST: Zu 100 ml 10 x PBS wurden 3 ml Triton X-100 hinzugefügt und auf 1 l destilliertes Wasser aufgefüllt.

30 %-ige Glucose-Lösung: 150 g Glucose wurden in 300 ml PBS gelöst (1 x, pH 7,4), dann wurde das Volumen mit destilliertem Wasser auf 500 ml erhöht.

4 % Paraformaldehyd-Lösung: 40 g Paraformaldehyd wurden bei 60° C in 900 ml PBS gelöst und dann wurde das Volumen auf 1000 ml mit destilliertem Wasser eingestellt.

denaturierender Lysepuffer (DLB): 2 ml destilliertes Wasser wurden mit 2 ml DLB, mit 400 µl Complete Inhibitor (Roche, Mannheim), mit 40 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail II (Sigma-Aldrich, München) und mit 8 µl Nonident vermischt.

BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA): Der Albumin Standard mit einer Albumin- Konzentration von 2 mg/ml in NaCl wurde mit destilliertem Wasser verdünnt, so dass Standardlösungen der Konzentration 0, 25, 50, 125, 250, 500 und 1000 µg/ml entstanden. Die Reaktionslösung wurde aus Lösung A und Lösung B im Verhältnis 50:1 kurz vor dem Gebrauch hergestellt.

4 x Trenngelpuffer: 150 ml 2 M Trishydroxymethylaminomethan mit einem pH-Wert von 8,8 (36,34g Tris in 150 ml destilliertem Wasser), 8 ml einer 10 %-igen SDS-Lösung (10 g SDS in 100 ml destilliertem Wasser) und 42 ml bidestilliertes Wasser wurden dafür zusammengefügt und vermischt.

4 x Sammelgelpuffer: Verwendet wurden 100 ml 1M Tris mit einem pH-Wert von 6,8 (12,1 g Tris in 100 ml destilliertem Wasser), 8 ml einer 10 %-igen SDS-Lösung und 92 ml bidestilliertes Wasser.

10 x Elektrophoresepuffer: 30 g Tris, 144 g Glycin und 100 ml einer 10 %-igen SDS-Lösung wurden bis zu einem Liter mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt (pH ~ 8,3). Als Arbeitslösung wurde eine 1:10 Verdünnung der Lösung hergestellt.

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung: Verwendet wurden die 40 %-ige Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung(39:1) der Firma Bio Rad Laboratories (München).

5 x Probenpuffer: 0,6 ml 1M Tris (mit einem pH-Wert von 6,8), 5 ml einer 50 %-igen Glycerol-lösung (50 ml Glycerol plus 50 ml destilliertes Wasser), 2 ml einer 10 %-igen SDS-Lösung, 0,5 ml β-Mercaptoethanol und 1 ml einer 1 %-igen Bromphenolblau-Lösung wurden miteinander vermischt.

Trenngel (12 % für 1,5 mm Plattenabstand): 3,0 ml der Acrylamidlösung, 4,5 ml destilliertes Wasser und 2,5 ml des 4 x Trenngelpuffers wurden gemischt. Zur Einleitung der Polymerisation wurden 10 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) und als Katalysator 100 µl einer 10 %-igen Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS) zugesetzt.

Sammelgel (12 % für 1,5 mm Plattenabstand): 0,5 ml Acrylamid-Lösung, 2,47 ml destilliertes Wasser und 1 ml 4 x Sammelgelpuffer wurden gemischt. Beim Sammelgel wurden 5 µl TEMED und 30 µl der APS-Lösung zugesetzt.

Markerlösung: Als Proteinmolekulargewichtsmarker wurde ein Breitband-Proteinmarker (2-212 kDa) der Firma New England Bio Labs (Frankfurt a. M.) verwendet.

Proteinleiter: Zur Markierung des Proteingewichts auf dem Film wurde ein biotinierter Proteinleiter (Cell Signal, Frankfurt a. M.) verwendet.

12% SDS-PAGE Separating Gel: Für 1 Gel wurden 2 ml 30 %-iges Acrylamid, 1,75 ml destilliertes Wasser, 1,25 ml Puffer, 50 µl von 10 %-igem APS und 5 µl TEMED benötigt.

10 x Transferpuffer: 5,82 g Tris, 2,93 g Glycin und 0,375 g SDS wurden bei einem pH-Wert von 9 bis 9,4 mit 250 ml Methanol destilliertem Wasser auf 1l aufgefüllt.

10 x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung): 60,57 g Tris und 43,83 g NaCl wurden in 500 ml Wasser gelöst (pH-Wert = 7,5).

1 x TTBS (= TBS mit Tween): 900 ml Wasser, 100 ml 10 x TBS und 1 ml Tween 20 (Calbiochem, Darmstadt) wurden zusammengefügt.

Blocklösung (= 4 %-ige fettfreie Milchpulverlösung): 4 g Magermilchpulver wurden in 100 ml TTBS gelöst.

ECL-Substratlösung: ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK): Lösung A und B wurden kurz vor dem Gebrauch im Verhältnis 25:1 gemischt.

Stripping-Lösung: 7,57 g Tris wurden in 600 ml destilliertem Wasser gelöst (pH = 6,7) und mit 20 g SDS sowie 14,3 ml β -Mercaptoethanol vermischt. Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf 1l aufgefüllt.

ABC-Lösung: Vectastain Elite ABC Reagenz der Firma Vector Laboratories (Wiesbaden): Zwei Tropfen vom Reagenz A wurden zu 5 ml PBST hinzugefügt. Danach wurden zwei Tropfen von dem Reagenz B hinzugegeben und dann 30 min stehen gelassen.

DAB-Lösung: Kit D 4418 der Firma Sigma (Steinheim): Eine 3,3'-Diaminobenzidine-Tetrahydro- chlorid-Tablette (10 mg DAB) und eine Tablette Wasserstoffperoxid wurden in 15 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde kurz vor Gebrauch zubereitet und im Dunklen aufbewahrt.

3 %-iges Bovines Serum Albumin (BSA): 3 g BSA-Pulver wurden in 100 ml PBST gelöst.

2.5 Entnahme der Gehirne für die Bestimmung von Infarktgröße und immunhistochemische Analysen

Die Gehirne der Versuchstiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen.

Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Expression von COX-2 und PPAR- γ wurden die Gehirne 2 Stunden, 1 Tag, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 Tage nach dem Schlaganfall entnommen. Zur immunhistochemischen Analyse der Expression von COX-1, COX-2 und TNF- α wurden die Gehirne 24 und 48 Stunden nach dem Schlaganfall entnommen.

Die Tiere wurden mit Chloralhydrat tief narkotisiert, der Brustkorb eröffnet und mit gekühlter PBS Lösung gefolgt von 4% iger Paraformaldehyd-Lösung transkardial perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen, für 24 Stunden in 4% iger Paraformaldehyd-Lösung nachfixiert,

für 72 Stunden in 30% -iger Saccharose-Lösung eingelagert, eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.6 Anfertigen der Gewebeschnitte

Die Gehirne wurden bei -20°C in einem Kryostaten (Leica CM3050 S, Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) in 40 µm dicke Schichten für die Bestimmung der Infarktgröße und die immunhistochemischen Untersuchungen geschnitten. Die Schnitte aus den entsprechenden 14 Schnittebenen (Bregma +3,7; +2,9; +2,1; +1,3; +0,5; 0, -0,3; -1,1; -1,9; -2,7; -3,5; -4,3; -5,1 und -6,7 mm) wurden auf mit Gelatine bezogene Objektträger aufgebracht und zur Bestimmung des Infarktvolumens verwendet. Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden 8 µm dicke Schnitte von Bregma ± 0mm bis Bregma -2 mm angefertigt und auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgebracht.

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an 40 µm dicken Schnitten (Bregma ± 0 mm bis Bregma -2,3 mm) durchgeführt, welche in 24-Well-Platten in 0,1% -iger Paraformaldehyd-Lösung eingebracht und bei 4°C gelagert wurden.

2.7 Bestimmung des Infarktvolumens

Für die Bestimmung des Infarktvolumens wurden die 40 µm dicken Schnitte mit Kresylviolett gefärbt. Die Gehirnschnitte wurden zunächst für 1 min in destilliertem Wasser gewaschen, anschließend mit 96 %- igem Ethanol dehydriert, für 15 min in Xylol entfärbt, für 3 min in 96 %-igem Ethanol inkubiert, danach für 1 min in destilliertem Wasser gewaschen und in 0,1 %- iger Kresylviolett-Lösung für 15 min gefärbt. In einem letzten Schritt wurden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser abgespült und nach Abtrocknung der Präparate wurden die Objektträger mit einem Deckglas versehen.

Auf jedem Schnitt wurde die Größe der Infarktfläche mit einer Digitalkamera (Victor Company of Japan, Color Video Camera) gescannt und mit Hilfe des Leica Image Analysis Systems die Größe des Infarktareals bestimmt. Das Infarktvolumen berechnete sich aus der Summe der gemessenen Areale und der Distanz zwischen den einzelnen Schnitten. Das Volumen der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre wurde bestimmt und aus der Differenz der Volumina das Hirnödem errechnet. Bei der Berechnung des Infarktvolumens wurde eine Korrektur nach Swanson et al., (1989) vorgenommen.

2.8 Nachweis von PPAR- γ , COX-1 und COX-2 mittels Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen basieren auf dem Einsatz von korrespondierenden Primär- und Sekundärantikörpern, die an Enzyme (Peroxidase) gekoppelt sind, welche dann in einer enzymkatalysierten Reaktion aus den farblosen Chromogenen einen Farbstoff bilden.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die 40 μ m dicken Gehirnschnitte zunächst in kalter PBST – Lösung für 5 min gewaschen und in einem Gemisch aus Methanol und 30 % -igem Wasserstoffperoxid im Verhältnis 100:1 für weitere 10 min bei Raumtemperatur belassen, um die endogene Peroxidase abzusättigen. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation in einer Pufferlösung, welche NGS (normal goat serum- Standard-Ziegen-Serum) enthielt, um unspezifische Bindungen von interferierenden Proteinen zu blockieren. Nach erneutem Waschen mit PBST wurden die Schnitte mit einem ersten Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zum Nachweis von PPAR- γ wurde ein polyklonaler *rabbit anti-rat PPAR- γ* Antikörper (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA), für COX-1 ein polyklonaler *rabbit anti-rat COX-1* Antikörper (1:1000, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) und für COX-2 ein polyklonaler *rabbit anti-rat COX-2* Antikörper (1:600, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) verwendet.

Am folgenden Tag wurden die nicht gebundenen Antikörper durch erneutes Waschen mit PBST (3x10 min) entfernt und mit einem an Biotin-gekoppelten zweiten Antikörper: *goat anti-rabbit* Antikörper (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Avidin-gekoppelte Peroxidase wurde während der nachfolgenden Inkubation (ABC-Kit, Vectastain Avidin-Biotin Komplex Peroxidase Kit, Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) an den zweiten Antikörper gebunden. Die Avidin-Biotin-Methode nutzt die starke Affinität von Avidin für Biotin zur Bindung von Enzym-markierenden Avidin-Biotin-Komplexen an biotinierte Sekundärantikörper aus. Anschließend wurden die Schnitte mit PBST gewaschen und für 20 min in DAB-Lösung (Diaminobenzidin; Stammlösung 5 mg/ml Trizma-Puffer, pH 7,6 bei 26°C) aufbewahrt. Die Farbreaktion wurde durch 0,02% -igem Wasserstoffperoxid initiiert. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen und mit einem Deckglas versehen. Die Anzahl der positiv markierter Zellen wurde mit Hilfe der Leica Image Analysis Software (Leica Qwin) in drei zufällig ausgewählten, sich nicht überschneidenden Bereichen des frontoparietalen Kortex von jeweils 0,125 mm² ermittelt.

2.9 Immunfluoreszenzfärbungen

Bei der Immunfluoreszenzfärbung bindet der Primärantikörper an ein Epitop des untersuchten Proteins. Der zweite Primärantikörper gegen einen spezifischen Zellmarker, der gleichzeitig hinzugegeben wird, ermöglicht die Bestimmung des entsprechenden Zelltyps. Im zweiten Schritt werden Sekundärantikörper aufgetragen, die mit einem Fluorochrom konjugiert und gegen die Primärantikörper gerichtet sind.

Gewebeschnitte (8 μm ; Bregma ± 0 bis Bregma -2 mm) wurden kurz mit kalter Acetonlösung fixiert und anschließend mit PBST gewaschen. In einer Pufferlösung (NGS-normal goat serum) wurden unspezifische Proteinbindungen blockiert. Die primären neuronalen Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht, mit 4% -iger Paraformaldehydlösung in PBS für 1 h bei 4°C fixiert und mit PBST Lösung gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper über 24 Stunden bei 4°C. Als Primärantikörper zum Nachweis von COX-2 wurde ein polyklonaler *rabbit anti-rat COX-2* Antikörper (1:600, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) und von PPAR- γ ein polyklonaler *rabbit anti-rat PPAR- γ* Antikörper (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA) verwendet.

Danach wurden die Gehirnschnitte oder die Zellen mit dem zweiten Primärantikörper gegen den jeweiligen Zelltyp in der Plastikkassette für 4 h bei 4 °C inkubiert.

Neurone: monoklonaler *mouse anti-NeuN* Antikörper (1:100, Chemicon, Temecula, USA), Mikroglia-Makrophagen: monoklonaler *mouse anti – CD-68 Oberflächen-protein* Antikörper (1:100, Serotec Ltd, Serotec, Oxford, Großbritannien), Astrozyten: polyklonaler *goat-anti glial fibrillary acidic protein (GFAP)* Antikörper (1:800, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA.) Die Schnitte wurden dreimal für 5 min mit PBST gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper, der an ein Fluorochrom gebunden war für 1 h bei 37 °C inkubiert (Alexa Fluor ® 546 *goat anti-rabbit* Antikörper; Alexa Fluor ® 488 *goat anti-mouse* Antikörper oder Alexa Fluor ® 546 *donkey anti-goat* Antikörper, Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Nach erneutem Auswaschen mit PBST wurden die Proben mit Hilfe von *Slow Fade® Light Antifade Reagenz* (Molekular Probes, Leiden, Niederlande) bedeckt, mit einem Deckgläschen auf den Objektträgern versiegelt und in Dunkelheit aufbewahrt.

2.10 Mikroskopie

Für die Analyse wurde ein Leica DMR Fluoreszenzmikroskop (Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Alle Bilder wurden mit der AxioCamMRm Kamera und dem Adapter TV 1,0 x (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) aufgenommen. Die Bearbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte mit dem AxioVision 4.5 Programm (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena).

2.11 Primäre Zellkulturen

Die neuronalen Zellen wurden aus der Hirnrinde neugeborener Ratten (bis zu 24 Stunden nach der Geburt) isoliert. Die Gehirne wurden entnommen, das kortikale Gewebe wurde auf eine Plastikschaale übertragen und in Stücke von weniger als 1 mm³ zerteilt. Nach 20 minütiger Inkubation in einer 0,25% igen Trypsin-Lösung, wurden die Gewebestücke mit einem Glasstab gemörsert. Die Zellen wurden dreimal für 4 min bei 1000 Umdrehungen pro min im neurobasalen Medium (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) gewaschen und in 3 ml des Mediums suspendiert.

Für die Immunfluoreszenzuntersuchung wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro *well* auf eine 4-*well* Platte transferiert und für die Western-Blot Analyse 2×10^6 Zellen auf eine Kulturschaale (35 mm) aufgebracht. Nach dem Austausch des Mediums wurden die Zellen bei 5 % CO₂ und 37°C im neurobasalen Medium gelagert, das mit 2% -iger B27 Supplement Lösung, 0,5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen; Carlsbad, Kalifornien, USA) versehen war. Sieben Tage nach dem Aussäen bestanden die Zellkulturen aus 80-90% Neuronen und 10-20% Astrozyten.

2.12 Western-Blot-Analyse

2.12.1 Gewebeentnahme und Proteinisolierung

Die Gehirne für die Western-Blot-Analyse wurden ohne die intrakardiale Perfusion entnommen. Mit Hilfe eines Operationsmikroskops wurden Gewebeproben aus dem ischämischen Bereich des rechten frontoparietalen Kortex sowie des ipsilateralen und des

kontralateralen Hippocampus isoliert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Die Gewebestücke der Rattengehirne aus dem Kortex und des Hippocampus wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und in eine Denaturierungspuffer-Lösung (2% -iger SDS Lösung, 1% -iger Phosphataseinhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Proteinaseinhibitor (Roche, Indianapolis, USA) in 20 mmol Tris Puffer) überführt. Die primären neuronalen Zellen wurden direkt in die Denaturierungspuffer-Lösung überführt. Nach einer Hitzedenaturierung im Heizblock (5 min bei 95°C) wurden die Proben für wenige Sekunden mit Ultraschall (zweimal 5 s) homogenisiert und dann zentrifugiert (15 min bei 13000 Umdrehungen pro min) bei 4°C . Der Überstand wurde zur Proteinbestimmung und Western-Blot-Analyse verwendet.

2.12.2 Messung des Proteingehalts

Das Proteinextrakt wurde in destilliertem Wasser gelöst und mit der BCA-Lösung (Working Reagenz) vermischt und bei 37°C für 30 min im Wärmeblock inkubiert. Die Proteinkonzentrationen der Zellextrakte wurden mit Hilfe des Pierce BCA Protein Reagent Kits (Pierce, Rockford, IL, USA) bestimmt. Die Standardlösungen (Albumin Konzentrationen: 0, 25, 50, 125, 250, 500 und $1000\ \mu\text{g/ml}$) und die zu messenden Proben (Verdünnung 1:50 mit destilliertem Wasser) wurden mit 1 ml des Proteinassay-Farbstoffkonzentrat 30 min bei 37°C im Wärmeblock inkubiert. Die photometrische Bestimmung der Konzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm (Hitachi U-2000 Spectrophotometer).

2.12.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde mit dem Mini-PROTEAN 3 System der Firma Bio-Rad Laboratories (München) durchgeführt. Das Trenngel wurde sofort nach Zugabe von TEMED und APS-Lösung mit einer Pasteurpipette luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und zur Begradigung der Kante mit etwas Wasser bedeckt. Nach der Polymerisierung des Gels wurde das Wasser abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Ein Kamm mit 15 Zinken wurde in das Sammelgel eingesetzt, der die Probestaschen formte. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt, die mit Elektrophoresepuffer gefüllt wurde.

Die Proteinproben (30 µg) wurden mit dem Chaps-Lysepuffer auf 16 µl aufgefüllt und mit 4 µl 5x Probenpuffer versetzt. Nach 5 min Inkubation bei 95°C und anschließendem Zentrifugieren wurden die Proben aufgetragen. Von Proteinmarker und Proteinleiter wurden jeweils 4 µl plus 12 µl Lysepuffer pro Gel verwendet.

Anschließend wurde die Spannung (200 V für 5 min, dann 150 V für 1 h) an das Gel angelegt.

2.12.4 Western-Blot

Der Western-Blot wird zum Nachweis von Proteinen genutzt. Dabei werden die vorher durch eine SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran transferiert und die Proteinbanden können mit Hilfe von spezifischen Immunreaktionen detektiert werden. Für den Western-Blot wurde der Elektrobloetter Transblot SD Cell (Bio Rad Laboratories, München) benutzt. Es wurden pro Blot zwei Filter (Extra dickes Filterpapier, Bio-Rad Laboratories, München, 10 x 7 cm) und eine Membran (Immobilon P 1500, Porengröße: 0,45 µm, Millipore, Schwalbach, 10 x 7 cm) zugeschnitten. Die Membran wurde 3 min in konzentriertem Methanol aktiviert und dann in destilliertes Wasser gelegt. Die Membran und die Filter wurden anschließend in Transferpuffer getaucht. Auf den Elektrobloetter wurden ein Filter und darauf die Membran gelegt. Das Gel wurde vom Sammelgel getrennt, in Transferpuffer gewaschen, auf die Membran gelegt und mit einem weiteren Filter abgedeckt. Nach Schließen des Gerätes wurde für 90 min ein konstanter Strom von 0,16 mA angelegt. Anschließend wurden die Filter und das Gel von der Membran entfernt und die Banden markiert. Alle Inkubations- und Waschvorgänge wurden auf der Schüttelmaschine (CAT RM5 oder ST5, M. Zipperer, Staufen) durchgeführt. Der Blot wurde für 30-60 min bei Raumtemperatur in der Blockierungs-Lösung gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert (*rabbit anti-rat COX-2* Antikörper, 1:10.000 Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA; bzw. *goat anti-rat TNF-α* Antikörper, 1:1000, Serotec, Düsseldorf, Deutschland). Am nächsten Tag wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (*donkey anti – rabbit*, 1: 3000, Amersham, Piscataway, USA, bzw. *donkey anti-goat*, 1:5000, Santa Cruz, Heidelberg) bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert und anschließend mit 1 x TTBS gewaschen.

Die Membran mit den aufgetragenen Proteinen wurden in der Dunkelkammer mit der ECL-Lösung bedeckt, mit einer Plastikfolie bedeckt und ein ECL-Film wurde auf den Blot gelegt, für unterschiedliche Zeiträume exponiert und danach mit der AGFA Curix 60 Entwicklermaschine entwickelt. Die Banden wurden gescannt und mit der Quantity One

Software der Firma Bio Rad Laboratories (München) die Pixelintensität des Blots ausgewertet. Die Werte wurden in Relation zu den Intensitäten der Banden für β -Aktin, einem ubiquitären Zellmarker gesetzt. Die Membranen wurden auch mit Ponceau S (Sigma-Aldrich) gefärbt, gescannt und mit einer Quantifizierungssoftware (Quantity one, Bio-Rad laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) analysiert.

2.12.5 Stripping der Western-Blot-Membran

Nach der ersten Färbung wurde die Western-Blot-Membran mit der *stripping-solution* 30 min bei 50 °C inkubiert, um die Komplexe aus Primär- und Sekundärantikörpern zu entfernen. Nach dem Entfernen der *stripping-solution*, anschließendem Waschen in TTBS und einer 30 minütigen Inkubation in Blocklösung konnte die Membran mit dem nächsten Primärantikörper inkubiert werden.

2.13 Protokolle

2.13.1 Auswirkung der icv Behandlung mit Vehikel und Pioglitazon auf die physiologischen Blutparameter vor, während und nach der zerebralen Ischämie

Fünf Tage vor der MCAO wurden die osmotischen Minipumpen implantiert (Vehikel: n=5; Pioglitazon: n=5). Drei Tage später wurde der Katheter in die A. femoralis gelegt und am 6. Tag nach der Implantation der Minipumpen wurde die Acm für 90 min verschlossen.

Es wurden die Werte für pH, pCO₂, pO₂, Glucose, K⁺, Na⁺, Cl⁻ in 200µl einer jeweiligen Blutprobe zu folgenden Zeitpunkten bestimmt (Radiometer ABL 735 Series (Radiometer Medical A/S Brønshøj, Dänemark):

- (A) vor der Narkose (am wachen Tier)
- (B) 30 min nach Induktion der Ischämie
- (C) 30 min nach Beginn der Reperfusion

2.13.2 PPAR- γ - und COX-2 positive Zellen im frontoparietalen Kortex nach fokaler zerebraler Ischämie: Zeitverlauf

Bei den Versuchstieren wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen Vehikel icv infundiert. Am Tag 6 wurde ein Schlaganfall induziert. Die Entnahme der Gehirne erfolgte zu folgenden Zeitpunkten: 12 Stunden, 1 Tag oder 2, 3, 4, 5, 6, 7 Tage nach dem Schlaganfall (4 – 5 Tiere pro Gruppe). Koronare Gehirnschnitte (40 μ m) wurden für den immunhistochemischen Nachweis von PPAR- γ und COX-2 verwendet. Für die Immunfluoreszenzdetektion von PPAR- γ in Neuronen, Mikroglia und Astrozyten wurden 8 μ m dicke Schnitte (Bregma \pm 0 mm bis Bregma -2 mm) benutzt.

2.13.3 Effekte von Pioglitazon auf die Expression von TNF- α , COX 1, COX-2 und die Infarktgröße nach einer zerebralen Ischämie

Mittels osmotischer Minipumpen wurde Vehikel (n=15) oder Pioglitazon (n=14) für einen Zeitraum von 5 Tagen vor der Induktion eines Schlaganfalls icv infundiert. Am 6. Tag wurde bei den Ratten dieser beiden Versuchsreihen die Acm für 90 min verschlossen. Der neurologische Status wurde 24 und 48 h nach dem Schlaganfall erhoben. Nach der letzten neurologischen Untersuchung (48 h nach der Okklusion der Acm) wurden die Tiere intrakardial perfundiert und die Gehirne entnommen.

Bei der Kontrollgruppe (n=4) wurde Vehikel-Lösung icv verabreicht, die sham-Operation durchgeführt (gleicher Operationsablauf, jedoch ohne Verschluss der Acm) und die Gehirne 2 Tage nach der Operation entnommen.

Die Ermittlung der Schlaganfall- und Ödemgröße wurde bei allen Tieren ermittelt, bei denen ein Schlaganfall induziert worden war (Pioglitazon, n=14, Vehikel n=15). Hierzu wurden 40 μ m dicke Gewebeschnitte aus insgesamt 14 festgelegten Hirnabschnitten (Bregma \pm 0, +3,7; +2,9; +2,1; +1,3; +0,5; -0,3; -1,1; -1,9; -2,7; -3,5; -4,3; -5,1 und -6,7 mm) mit Kresylviolett angefärbt.

Zur Quantifizierung der COX-1 und COX-2 - positiven Zellen im frontoparietalen Kortex mittels Immunhistochemie wurden 40 μ m dicke Schnitte aus den Bereichen Bregma \pm 0, -1,3 und - 2,3 mm verwendet (Vehikel: n = 6, Pioglitazon: n = 6, Kontrollgruppe: n = 4). Die Immunfluoreszenzuntersuchungen zur Ermittlung des Zelltyps, welcher unter den Ischämiebedingungen COX-2 exprimiert, wurden an 8 μ m dicken Gehirnschnitten aus dem Randgebiet des Infarktkerns durchgeführt. Die immunhistochemische Quantifizierung von

TNF- α erfolgte 24 h nach der Schlaganfallinduktion, da die Expression des Zytokins sehr rasch nach Beginn der Ischämie induziert wird (Sham: n = 4, Vehikel: n = 6, Pioglitazon: n = 7).

Die Western-Blot-Analyse von COX-2 wurde im ipsilateralen frontoparietealen Cortex im Randgebiet des Infarktkerns, dem entsprechenden kortikalen Gewebe in der kontralateralen Hemisphäre und im Hippocampus ipsilateral und kontralateral durchgeführt.

Die Expression von TNF- α wurde im ischämischen Bereich des frontoparietalen Kortex untersucht. Die Ratten wurden mit Pioglitazon oder Vehikel icv vorbehandelt. Am 6. Tag wurde der Schlaganfall herbeigeführt. Die Gehirnentnahme erfolgte 24 h (Bestimmung von TNF- α , Vehikel: n=6; Pioglitazon: n=5) oder 48 h (Bestimmung von COX-2, Vehikel: n=5; Pioglitazon: n=5) nach der Schlaganfallinduktion.

2.13.4 PPAR- γ und COX-2 Expression in primären neuronalen Zellkulturen nach Induktion von oxidativem Stress

Sieben Tage nach dem Aussäen der Zellen erfolgten die Kontrolle des neuronalen Zellgehalts in den Zellkulturen und die Stimulation der Neurone. Am 7. Tag wurde auch die Expression von PPAR- γ mittels Immunfluoreszenzmethode untersucht.

In dem ersten Versuchsansatz wurden die Zellen mit Wasserstoffperoxid behandelt, um einen starken oxidativen Stress zu simulieren. Die optimale Wasserstoffperoxidkonzentration und Einwirkzeit wurden in vorangegangenen Experimenten ermittelt. Die Zellkulturen wurden drei unterschiedlichen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (100, 200 und 400 μ M) für die Dauer von jeweils 2, 4, 8 oder 24 Stunden ausgesetzt. Als Parameter für die Toxizität und den Zelltod wurde die Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) gemessen. Hierbei zeigte sich ein bis zu vierfacher Anstieg der LDH Konzentration bei einer 24-stündigen Vorbehandlung der Zellen im 100 μ M Wasserstoffperoxid. Die Wasserstoffperoxid-Konzentration von 100 μ M und die Expositionsdauer von 24 h wurden daher in allen nachfolgenden Versuchen verwendet. Die Inkubation der Zellen mit Pioglitazon allein oder dem PPAR- γ –Antagonisten GW 9662 über einen Zeitraum von 24 Stunden zeigte keinen Anstieg der LDH Konzentration. Zur Ermittlung der Expression von COX-2 wurden die Neurone für 24 Stunden dem Wasserstoffperoxid (100 μ M Konzentration im Medium) ausgesetzt und die Expressionsrate mittels der Immunfluoreszenzmethode untersucht.

Im zweiten Versuchsansatz wurde die Wirkung von Pioglitazon auf die Expression von COX-2 in Wasserstoffperoxid beschädigten Zellen untersucht. Folgende Gruppen werden verglichen:

1. eine mit Vehikel behandelte Zellkultur
2. eine mit Wasserstoffperoxid (100 μ M) stimulierte Zellkultur
3. eine mit Wasserstoffperoxid – stimulierte und zusätzlich mit Pioglitazon (1 μ M, 30 min vor der Wasserstoffperoxid Applikation) vorbehandelte Zellkultur und
4. eine mit Wasserstoffperoxid – stimulierte und zusätzlich mit Pioglitazon (1 μ M) und GW 9662 (1 μ M) vorbehandelte Zellkultur. Pioglitazon und GW 9662 wurden 30 min vor der Gabe von Wasserstoffperoxid appliziert.

Die Inkubation dauerte 24 h. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen entweder für Immunfluoreszenzuntersuchungen in 4 % -iger Paraformaldehydlösung fixiert oder für die Western-Blot-Analyse von COX-2 lysiert.

2.14 Statistische Analyse

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung des Blutflusses und der neurologischen Defizite erfolgte über eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (MANOVA) gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test. Der Vergleich der Infarktgröße bei der Pioglitazon- bzw. Vehikel-Gruppe wurde mit einer zweifachen Varianzanalyse mit wiederholten Messungen, gefolgt von einem post-hoc-Bonferroni-Test analysiert. Die Effekte eines Schlaganfalles auf den zeitlichen Verlauf der Expression von PPAR- γ und COX-2 wurden mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem post-hoc Dunnett-Test ausgewertet. Die Ergebnisse der unterschiedlichen COX-1 und COX-2 Expression mittels Immunhistochemie wurden mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem post-hoc-Bonferroni Test analysiert. Der Student's t-Test wurde bei der Auswertung der Expression von TNF- α und COX-2 im frontoparietalen Cortex und dem Hippocampus herangezogen. Zur Bewertung der COX-2 positiven Zellen in der primären Zellkultur wurde wiederum die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem post-hoc-Bonferroni Test verwendet. Eine statistische Signifikanz wurde ab einem $P < 0,05$ angenommen.

Das Tierversuchsvorhaben wurde von der Tierschutzkommission des Ministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

3 Ergebnisse

3.1 Regionaler zerebraler Blutfluss (rCBF)

Eine Reduktion des rCBF um mehr als 75 % zeigte einen erfolgreichen Verschluss der Acm an. Die gemessenen Werte für den rCBF während des Verschlusses der Acm und während der Reperfusionphase waren bei den mit Pioglitazon- und Vehikel – behandelten Tieren vergleichbar. Zehn Minuten nach Verschluss der Acm sank der rCBF um 83 % bei beiden Gruppen. Dreißig min nach MCAO lagen die Werte für Vehikeltiere bei 20 % und für Pioglitazon-behandelte Tiere bei 17 % der Ausgangswerte. In der Reperfusionphase stieg der rCBF an und erreichte nach 30 min bei den Vehikel-behandelten Tieren 69 % und bei den Pioglitazon-behandelten Tieren 66 % des Ausgangswertes. Abbildung 1 zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messwerten der mit Pioglitazon – und mit Vehikel - behandelten Tiere festzustellen waren.

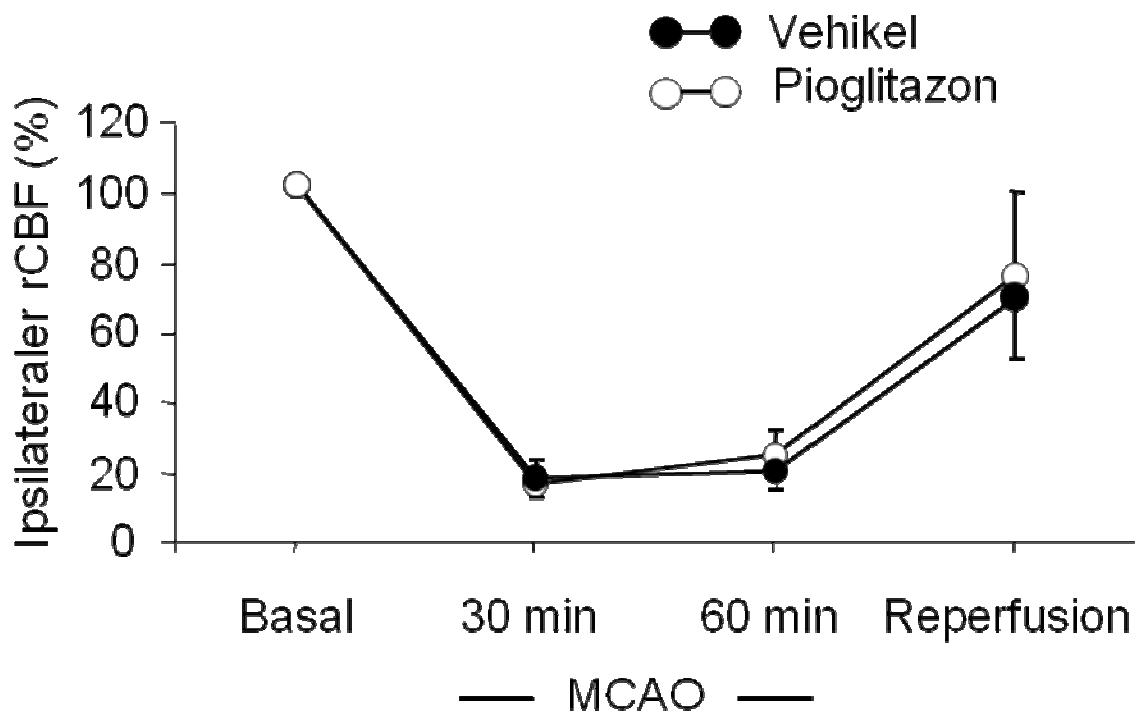


Abbildung 1. Veränderungen des regionalen Blutflusses (rCBF) 30 und 60 min nach dem Verschluss der Acm und in der Reperfusionphase in dem ischämischen Gehirnnareal bei Vehikel- und Pioglitazon- behandelten Tieren. Die Werte für den rCBF (Mittelwert \pm SEM) sind als Prozentsatz des Ausgangswertes (vorm Verschluss der Acm) dargestellt.

3.2 Physiologische Parameter im Blut

Den Ratten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten vor und während der Ischämie sowie in der Reperfusionphase Blutproben aus dem arteriellen Katheter entnommen. Es wurden zu jedem Zeitpunkt der Entnahme keine Unterschiede zwischen den Vehikel- und Pioglitazon-behandelten Tieren bei den folgenden Blutparametern sowie bei der Körpertemperatur festgestellt: pH- Wert, CO₂- Partialdruck, O₂- Partialdruck, Glucosespiegel sowie die Konzentration von Kalium, Natrium, und Chlorid (Tabelle 1).

Tabelle 1. Physiologische Parameter in Blut: pH- Wert, pCO₂, pO₂, Glucose-, Kalium-, Natrium- und Chlorid- Konzentration und die Körpertemperatur bei Vehikel- und Pioglitazon- behandelten Ratten vor, während und nach MCAO.

Parameter	Vehikel	Pioglitazon
Vor Acm Verschluss		
Körpertemperatur	37.0 ± 0.2	37.0 ± 0.1
pH Wert	7.33 ± 0.01	7.34 ± 0.01
pCO ₂ , mmHg	54 ± 2.5	52 ± 2.1
pO ₂ , mmHg	86.0 ± 0.9	84.2 ± 3.3
Glucose, mg/dl	115 ± 4.2	125 ± 9.9
Kalium, mmol/l	5.6 ± 0.2	5.9 ± 0.2
Natrium, mmol/l	134.2 ± 0.8	131 ± 0.8
Chlorid, mmol/l	100 ± 0.0	100 ± 0.0
30 min nach Acm Verschluss		
Körpertemperatur	36.9 ± 0.1	37.0 ± 0.1
pH Wert	7.35 ± 0.01	7.33 ± 0.02
pCO ₂ , mmHg	59.4 ± 3.6	63.4 ± 3.5
pO ₂ , mmHg	82.0 ± 3.1	85.8 ± 1.6
Glucose, mg/dl	136 ± 8.0	130 ± 7.6

Kalium, mmol/l	5.7 ± 0.2	5.6 ± 0.3
Natrium, mmol/l	133.6 ± 0.7	131.0 ± 1.1
Chlorid, mmol/l	100 ± 1.2	101 ± 0.9
Reperfusion		
Körpertemperatur	37.1 ± 0.2	37.0 ± 0.2
pH Wert	7.33 ± 0.02	7.34 ± 0.01
pCO ₂ , mmHg	48.6 ± 1.3	48.0 ± 1.9
pO ₂ , mmHg	87.8 ± 4.5	90.2 ± 3.1
Glucose, mg/dl	128.0 ± 6.4	115.4 ± 4.0
Kalium, mmol/l	6.0 ± 0.4	6.3 ± 0.4
Natrium, mmol/l	130.4 ± 0.8	132.0 ± 1.2
Chlorid, mmol/l	101 ± 0.3	105 ± 3.8

Die Ergebnisse (n=5) sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen der Versuchstiere (zweifache Varianzanalyse mit wiederholten Messungen).

3.3 Infarktverhalten, Hirnödeme und Gesamtsterblichkeit

Die ischämischen Gehirnschäden betrafen das Gebiet der AcM. Dieses besteht aus Teilen des frontoparietalen Kortex und des frontotemporalen Kortex, sowie den seitlichen und medialen Segmenten des Corpus striatum. Die Auswertung der Schlaganfallsvolumina-Messungen zeigte, dass die icv Vorbehandlung mit Pioglitazon die Größe des Schlaganfallgebietes und das Hirnödem im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren deutlich verringerte (Schlaganfallvolumen: Vehikel: 244 ± 17 mm³; Pioglitazon: 154 ± 19 mm³, P < 0,05). Die Verringerung der Infarktgröße war in 7 von 15 untersuchten Hirnebenen signifikant geringer (F = 9,36; P < 0,01).

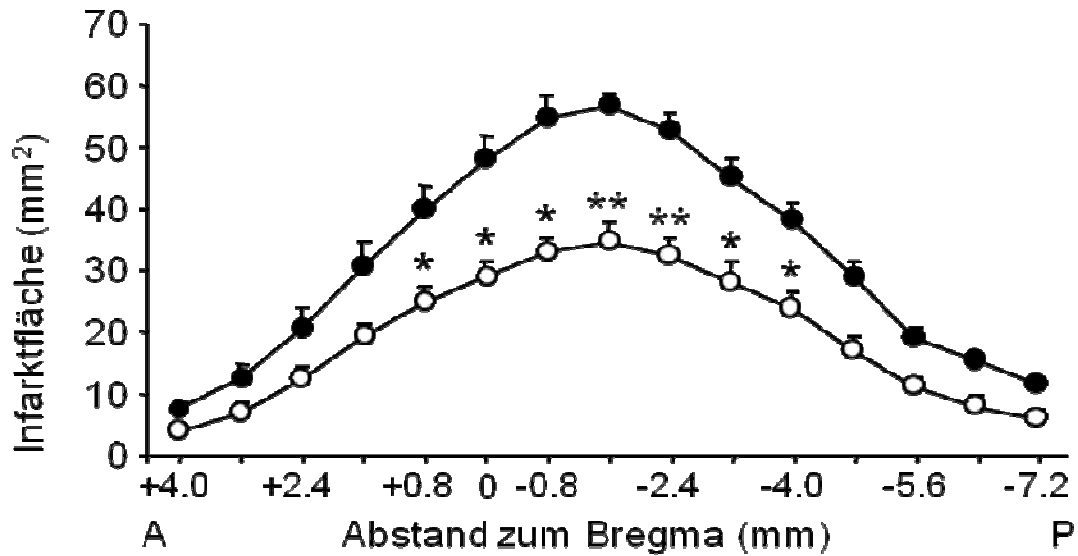


Abbildung 2. Auswirkung von intrazerebroventrikulärer Vorbehandlung mit Vehikel- (ausgefüllte Kreise) und Pioglitazon (offene Kreise) auf die Infarktgröße an 15 Schnittebenen des Gehirns 48 h nach MCAO mit anschließender Reperfusion. Die x-Achse zeigt den anterioren (A) und posterioren (P) Abstand zum Bregma. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Der Vergleich zu Vehikel-behandelten Ratten wurde errechnet mittels zweifacher Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen, gefolgt von einem post-hoc-Bonferroni-Test.

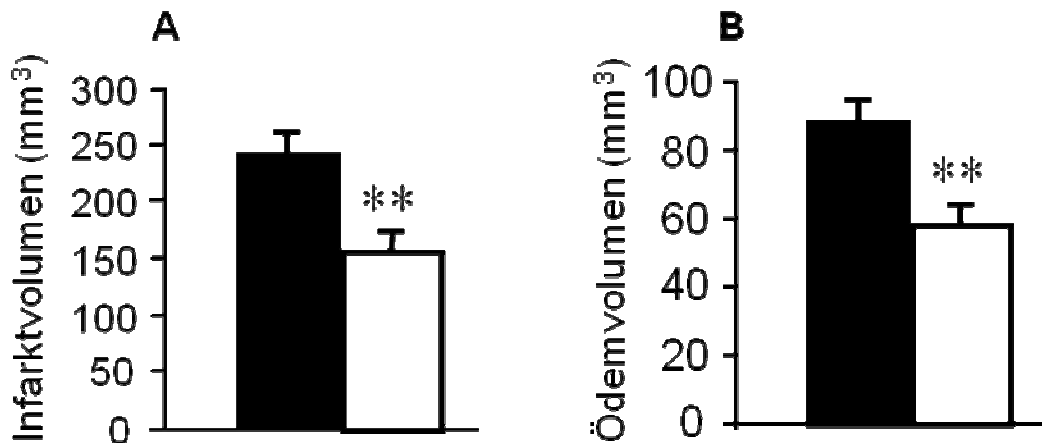


Abbildung 3. Auswirkung der intrazerebroventrikulären Vorbehandlung mit Vehikel- (ausgefüllte Säulen) und Pioglitazon (offene Säulen) auf das Infarktvolume sowie das Hirnödem 48 h nach MCAO mit anschließender Reperfusion. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. ** $P < 0,01$ Vergleich zu Vehikel-behandelten Ratten, Student's T-Test.

Zur Gesamtsterblichkeit: In beiden Gruppen starben 6 Ratten innerhalb von zwei Tagen nach dem Schlaganfall.

3.4 Neurologischer Status

Bei der Bewertung des neurologischen Status nach Bederson et al. (1986) wurden die motorischen Defizite beurteilt. Je höher der Gesamtscore war, desto größer war die motorische Beeinträchtigung. 24 und 48 h nach MCAO war das Ausmaß der motorischen Ausfälle bei beiden Gruppen von Ratten vergleichbar (Vehikel-Gruppe: $2,1 \pm 0,2$; Pioglitazon-Gruppe: $1,9 \pm 0,2$).

Bei der Beurteilung des neurologischen Status nach Garcia et al. (1995) wurden motorische und sensorische Defizite quantifiziert. Kleinere Punktzahlen entsprachen einer starken neurologischen Beeinträchtigung, höhere Punktzahlen deuteten auf geringere neurologische Defizite hin. Auf einer Skala von 3 bis 18 Punkten bedeuteten 3 Punkte erhebliche neurologische Ausfälle und 18 Punkte entsprachen dem Befund bei einer vollständig gesunden Ratte (Garcia et al., 1995). Die mit Pioglitazon behandelten Tiere zeigten 48 h nach MCAO im Gesamtscore einen besseren neurologischen Status als die mit Vehikel behandelten Tiere ($F = 6,075$; $P < 0,05$; Abb. 4 A). Die Beeinträchtigung der Motorik war in beiden Versuchsgruppen vergleichbar ($F = 1,061$, $P = 0,31$; Abbildung 4 B). Im Gegensatz dazu zeigten sich jedoch nach 48 Stunden signifikant geringere sensorische Defizite bei den mit Pioglitazon behandelten Ratten ($F_{1,27} = 10,827$, $P < 0,01$; Abbildung 4 C).

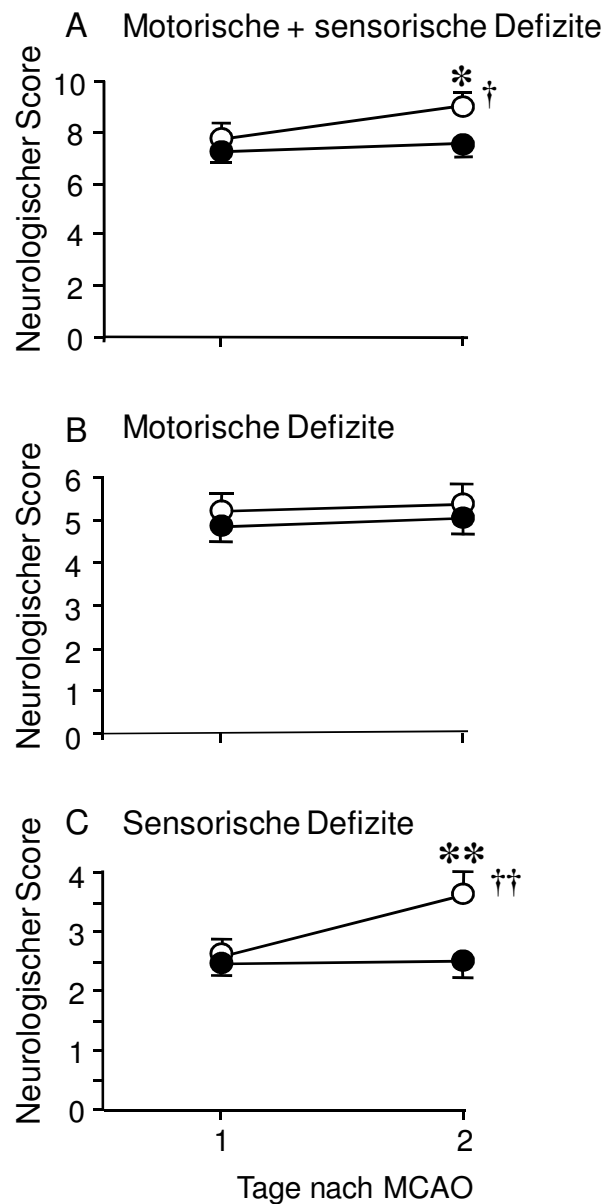


Abbildung 4. Neurologische Evaluation der mit Vehikel-behandelten (ausgefüllte Kreise) und mit Pioglitazon-behandelten Versuchstiere (offene Kreise) 24 und 48 h nach MCAO (Garcia et al. 1995). 4 A: Gesamtscore der motorischen und sensorischen Ausfälle; 4 B: Motorische Defizite; 4 C: sensorische Defizite. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren 48 h nach MCAO; † $P < 0,05$ und †† $P < 0,01$ Vergleich zu Werten ermittelt 24 h nach MCAO bei der gleichen Gruppe der Tiere, errechnet mit mehrfaktorieller Varianzanalyse, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test.

3.5. PPAR- γ positive Zellen im ischämischen frontoparietalen Kortex nach MCAO

In einem ersten Schritt untersuchten wir den zeitlichen Verlauf der Expression von PPAR- γ in Zellen nach einer zerebralen Ischämie. Die höchste Akkumulation der PPAR- γ positiven Zellen im frontoparietalen Kortex am Rande des ischämischen Kerns wurde 12 h nach MCAO registriert. Nach diesem Zeitpunkt ist die Zahl der PPAR- γ -positiven Zellen zurückgegangen und erreichte nach 24 Stunden die Ausgangswerte (Abbildung 5).

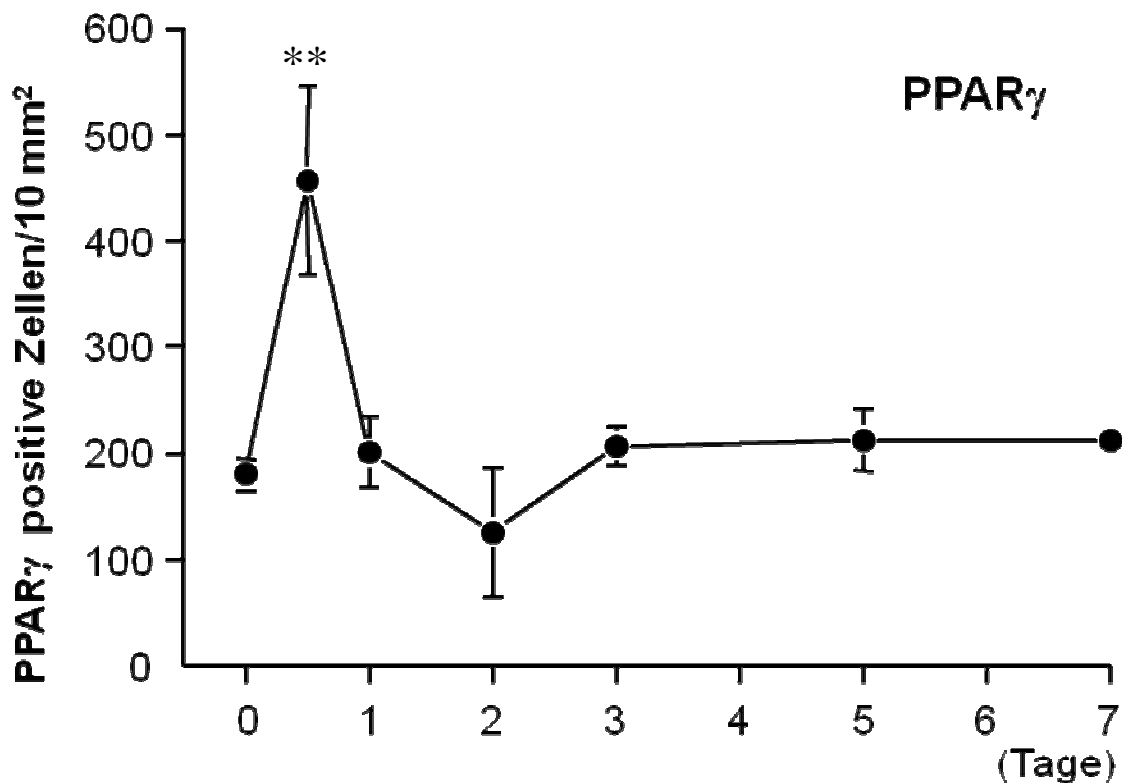


Abbildung 5. Zahl der PPAR- γ – positiven Zellen im kortikalen Peri-Infarktgebiet über einem Zeitraum von 7 Tagen nach MCAO. Die Versuchstiere (n=4-5) wurden in den angegebenen Zeitpunkten getötet und die Zahl der PPAR- γ – positiven Zellen in Gehirnschnitten ermittelt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. **P<0,01, statistischer Vergleich zu Kontrolltieren, errechnet mit ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test.

Zusätzlich untersuchten wir, in welchen Zellen der PPAR- γ nach dem Schlaganfall exprimiert wird. Aufschluss über den Zelltyp, welcher den Rezeptor exprimiert, gab die Immunfluoreszenzuntersuchung. Die Kolo-kalisation des PPAR- γ mit dem Oberflächenprotein CD 68, einem Marker für aktivierte Mikroglia/Makrophagen und mit NeuN, einem Marker

für Neurone zeigte, dass nahezu alle Mikrogliazellen den Rezeptor exprimierten (Abbildung 6). Im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten konnten wir zeigen, dass der PPAR- γ auch in Neuronen im ischämischen Gewebe induziert wurde (Abbildung 7). Dagegen exprimierten nur wenige Astrozyten den PPAR- γ (Daten nicht gezeigt).

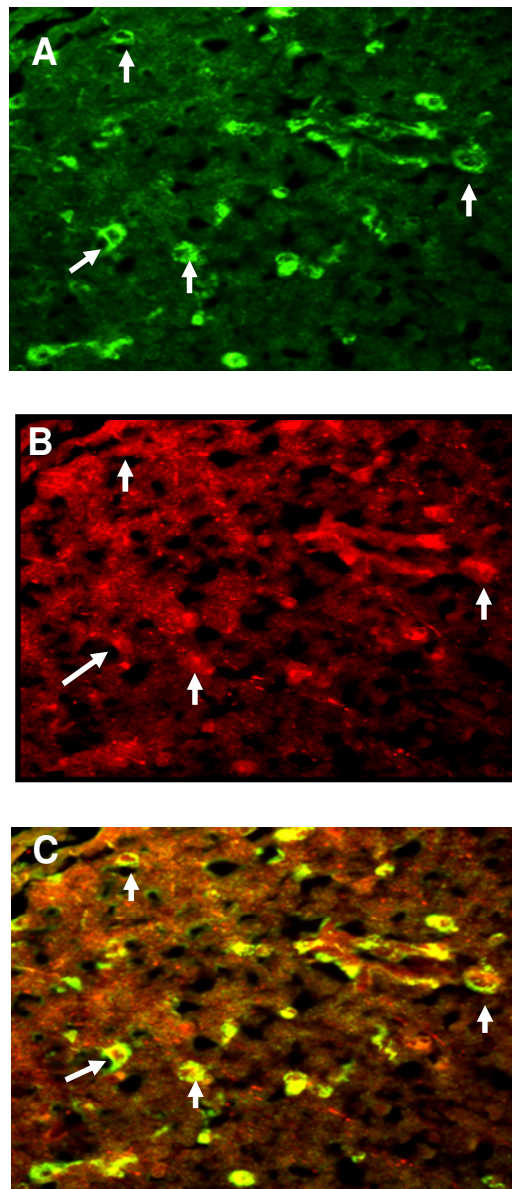


Abbildung 6: Detektion des PPAR- γ Rezeptors in aktivierten Mikroglia Zellen/ Makrophagen (A, B, C). Dargestellt sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung im frontoparietalen Kortex am Rand des ischämischen Kerns. A) Färbung von CD-68 (grün); B) Färbung des PPAR- γ (rot); C) Kolokalisation des PPAR- γ mit CD-68 (gelb). Die weißen Pfeile zeigen die PPAR- γ -positiven Mikroglia/Makrophagen.

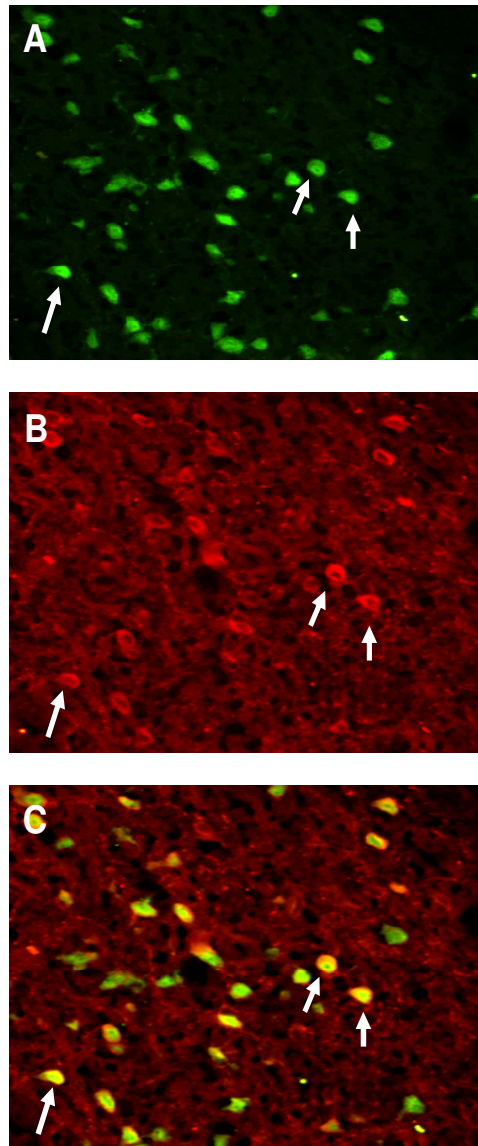


Abbildung 7: Detektion des PPAR- γ Rezeptors in Neuronen (A, B, C). Dargestellt sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung im frontoparietalen Kortex am Rand des ischämischen Kerns. A) Färbung von Neuronen (Neu N) (grün), B) Färbung des PPAR- γ (rot), C) Kolokalisation des PPAR- γ mit Neu N (gelb). Die weißen Pfeile zeigen die PPAR- γ -positiven Neurone.

3.6. TNF- α im ischämischen frontoparietalen Kortex nach MCAO

Verletzte Zellen setzen nach einem ischämischen Ereignis sehr schnell inflammatorische Zytokine, u.a. IL-1 β und TNF- α frei. Bereits 12 Stunden nach dem Schlaganfall lässt sich die TNF- α DNA im ischämischen Gewebe nachweisen (Hallenbeck, 2002). Deshalb wurde die Expression von TNF- α in Vehikel- und Pioglitazon- behandelten Tieren 24 h nach MCAO untersucht. Die Ergebnisse aus der Western-Blot-Analyse sind in der Abbildung 8 dargestellt. Vierundzwanzig Stunden nach der fokalen zerebralen Ischämie erhöhte sich der Spiegel von TNF- α im ischämischen frontoparietalen Kortex. Durch die icv Behandlung mit Pioglitazon wurde die Induktion von TNF- α signifikant gehemmt (Abbildung 9).

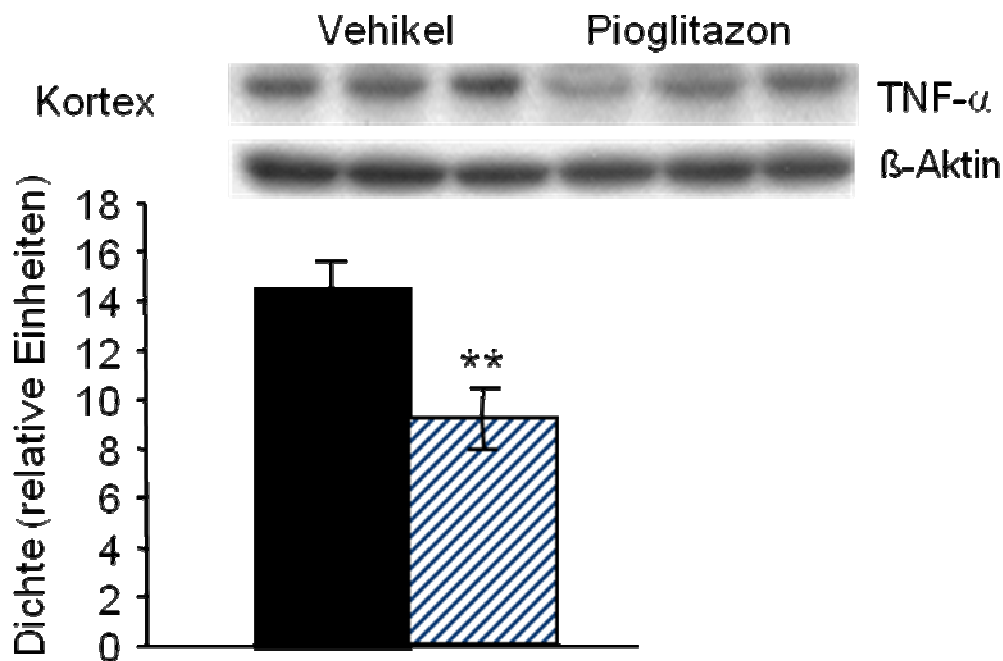


Abbildung 8. Western-Blot-Analyse von TNF- α -Expression 24 h nach MCAO. Pioglitazon hat die Expression von TNF- α im ischämischen frontoparietalen Kortex signifikant reduziert. Das Diagramm zeigt die Intensität der Bande relativ zu β -Aktin. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. ** $P < 0,01$, statistischer Vergleich mit Student's t -Test.

Die immunhistochemischen Untersuchungen haben diesen Befund bestätigt. Im Vergleich zu den sham-operierten Tieren (ohne Apoplex) zeigen die mit Vehikel behandelten Tiere einen signifikanten Anstieg der TNF- α – positiven Zellen im ischämischen frontoparietalen Kortex.

Die Behandlung mit Pioglitazon reduzierte deutlich die Zahl der TNF- α – positiven Zellen auf Werte, die sich nicht signifikant von denen bei sham-operierten Ratten unterschieden (Abbildung 9).

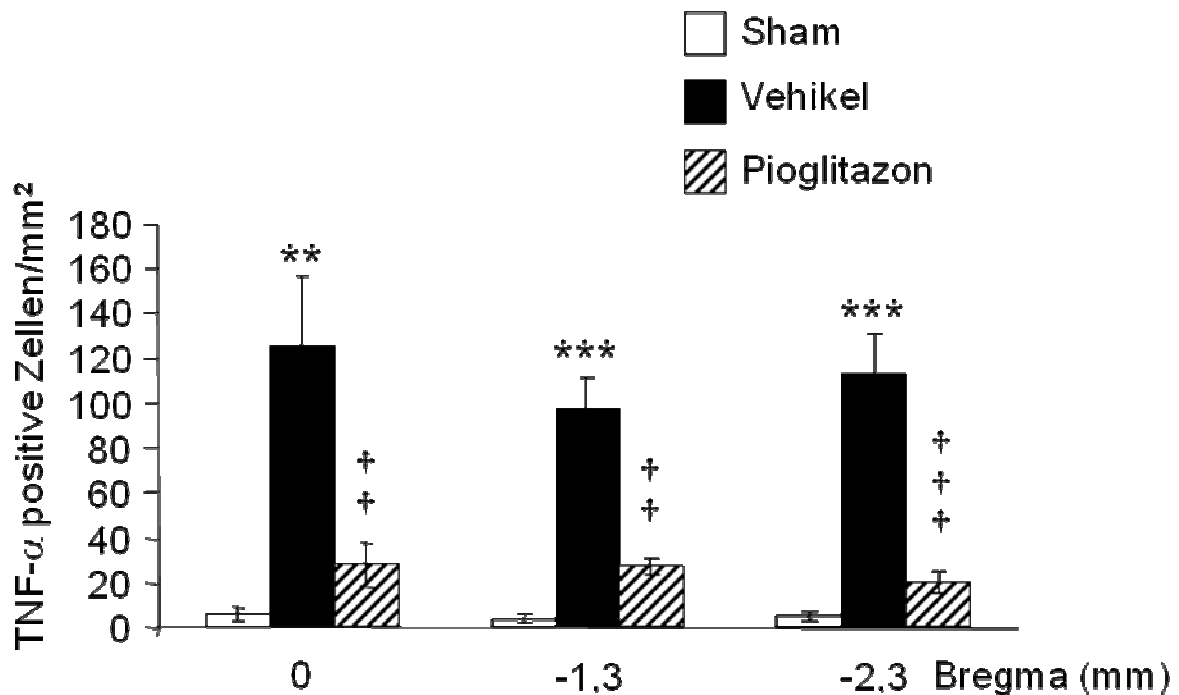


Abbildung 9. Anzahl der TNF- α -positiven Zellen im ischämischen frontoparietalen Kortex 24 h nach MCAO. Das Diagramm zeigt Ergebnisse aus immunhistochemischen Untersuchungen aus drei verschiedenen Gehirnebenen. Verglichen werden die Zahlen der TNF- α -positiven Zellen bei sham-operierten Tieren, Vehikel- und Pioglitazon-behandelten Tieren. ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$, der statistische Vergleich mit sham-operierten Tieren; †† $P < 0,01$ und ††† $P < 0,001$, statistischer Vergleich mit Vehikel-behandelten Tieren, berechnet mit ANOVA gefolgt von Bonferroni post-hoc Test.

3.7 COX-2 und COX-1 im ischämischen frontoparietalen Kortex nach MCAO

3.7.1 Zeitverlauf der Akkumulation von COX-2- positiven Zellen

Die Abbildung 10 zeigt den zeitlichen Verlauf der Akkumulation von COX-2-positiven Zellen im ischämischen kortikalen Gewebe. Diese Ergebnisse wurden an Versuchstieren aus der Vehikel-Gruppe ermittelt. Ein signifikanter Anstieg der Zellzahl wurde bereits nach 12 Stunden registriert und das Maximum wurde 48 Stunden nach der Induktion einer zerebralen Ischämie erreicht. ($F_{6,37}=28,843$; $P < 0,01$). Die höchste Anzahl COX-2 positiver Zellen wurde

in unmittelbarer Nähe vom ischämischen Kerngebiet beobachtet. Auch nach 2 Tagen war ein Anstieg noch erkennbar. Danach ist die Zahl der COX-2 positiven Zellen gesunken (Abbildung 10).

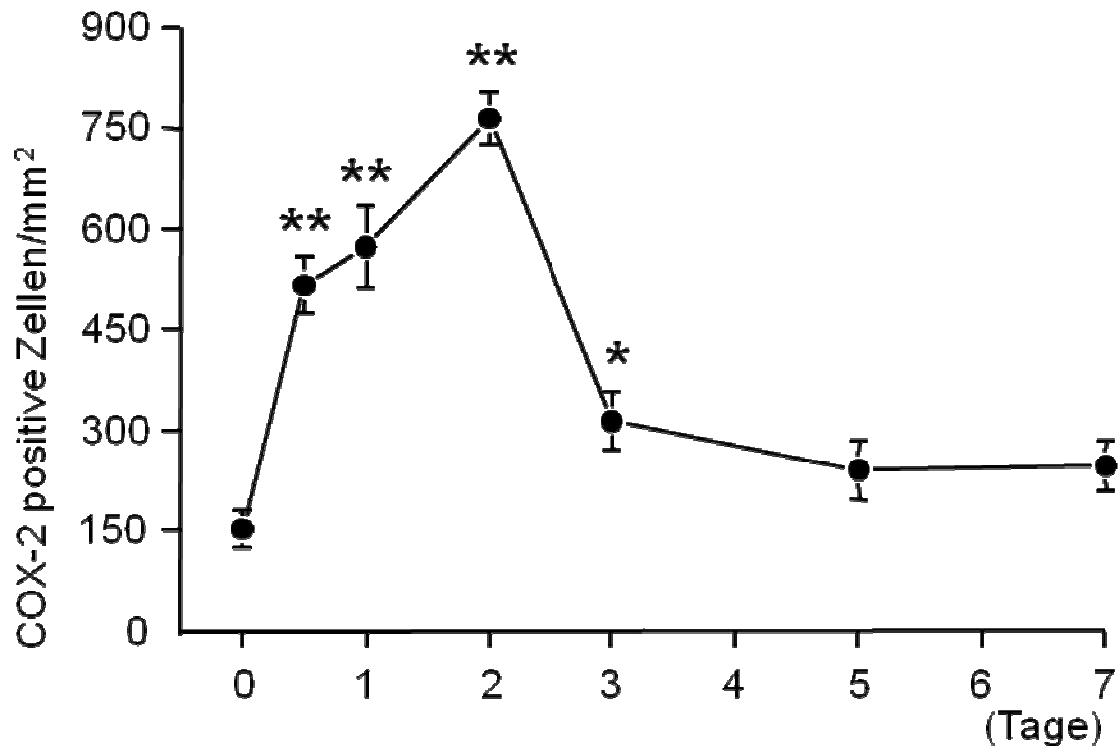


Abbildung 10. Zahl der COX-2 – positiven Zellen im kortikalen ischämischen Gebiet über einem Zeitraum von 7 Tagen nach MCAO. Die Versuchstiere (n=4-5) wurden in den angegebenen Zeitpunkten getötet und die Zahl der COX-2– positiven Zellen in Gehirnschnitten ermittelt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, statistischer Vergleich zu Kontrolltieren, berechnet mit ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test.

3.7.2 COX-2 Expression im Kortex und im Hippocampus

Nach der zerebralen Ischämie erhöhte sich der Spiegel von COX-2 im ipsilateralen Kortex und Hippocampus. Durch die icv Behandlung mit Pioglitazon wurde die Überexpression von COX-2 in beiden Hirnarealen signifikant gehemmt (Abbildung 11).

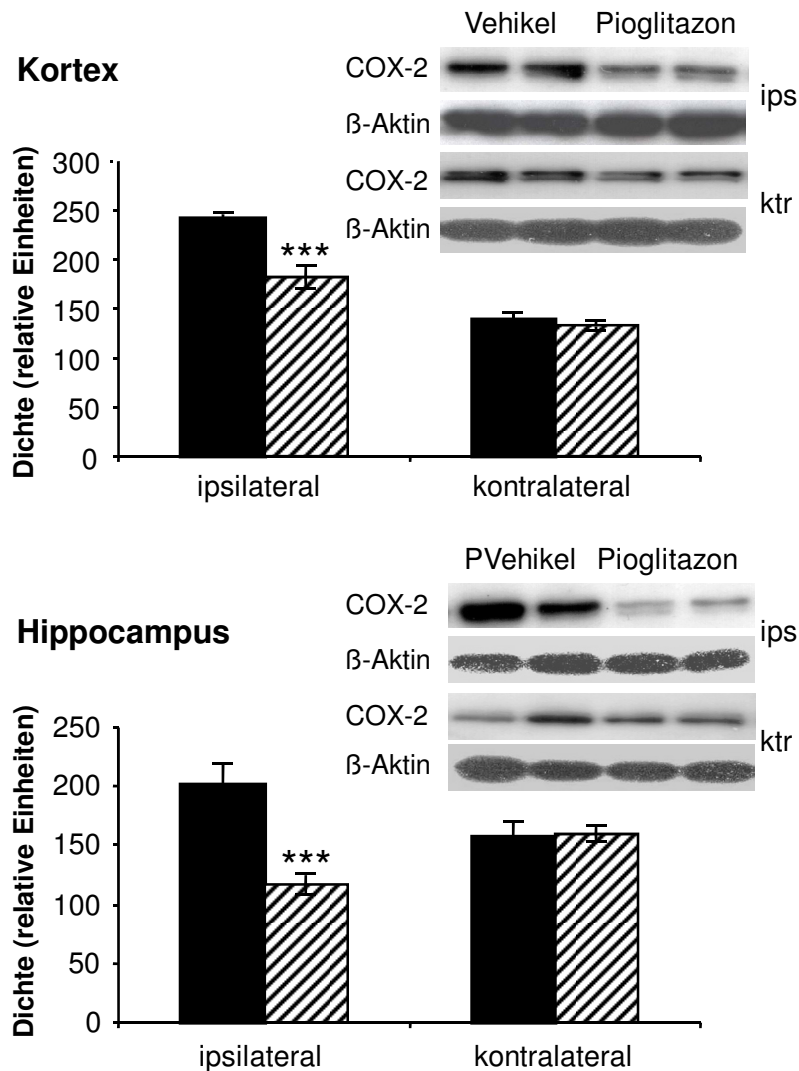


Abbildung 11. Western-Blot-Analyse von COX-2-Expression im ipsilateralen und kontralateralen Kortex und im Hippocampus bei Ratten, behandelt mit Vehikel (schwarze Säulen) und Pioglitazon (gestreifte Säulen) 48 h nach MCAO. Pioglitazon hat die Expression von COX-2 im ipsilateralen ischämischen frontoparietalen Kortex und im ipsilateralen Hippocampus reduziert. Das Diagramm zeigt die Intensität der Bande relativ zu β -Aktin. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *** $P < 0,01$, statistischer Vergleich mit den Vehikel-Tieren (Student's t -Test).

3.7.3 COX-2- und COX-1 positive Zellen im frontoparietalen Kortex nach zerebraler Ischämie

Die immunhistochemischen Untersuchung der COX-2 Expression im frontoparietalen Kortex am Rande des ischämischen Kerns erfolgte 48 Stunden nach MCAO, da zu diesem Zeitpunkt die höchste Anzahl der COX-2 – positiven Zellen festgestellt wurde. Wie erwartet, zeigte sich bei den mit Vehikel behandelten Tieren eine sehr starke COX-2 Induktion in drei Hirnebenen (Bregma \pm 0,0 mm: $F_{2, 12} = 27,16$; $P < 0,001$; Bregma – 1,3 mm: $F_{2, 12} = 41,08$, $P < 0,001$; Bregma -2,3 mm: $F_{2, 13} = 29,45$, $P < 0,001$). Die icv Behandlung mit Pioglitazon führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von COX-2 positiven Zellen (Abb.12). Im Vergleich zu COX-2 war die Zahl der COX-1 positiven Zellen deutlich niedriger. In der Hirnebene Bregma \pm 0 zeigte sich keine signifikante Verringerung bei Pioglitazon-behandelten Tieren. In den andere Hirnebenen führte Pioglitazon zu einer deutlichen Verminderung der COX-1 positiven Zellen (Bregma -1,3: $F_{2,13} = 9,14$, $P < 0,01$; Bregma – 2,3: $F_{2,13} = 3,84$, $P < 0,05$) (Abb. 12).

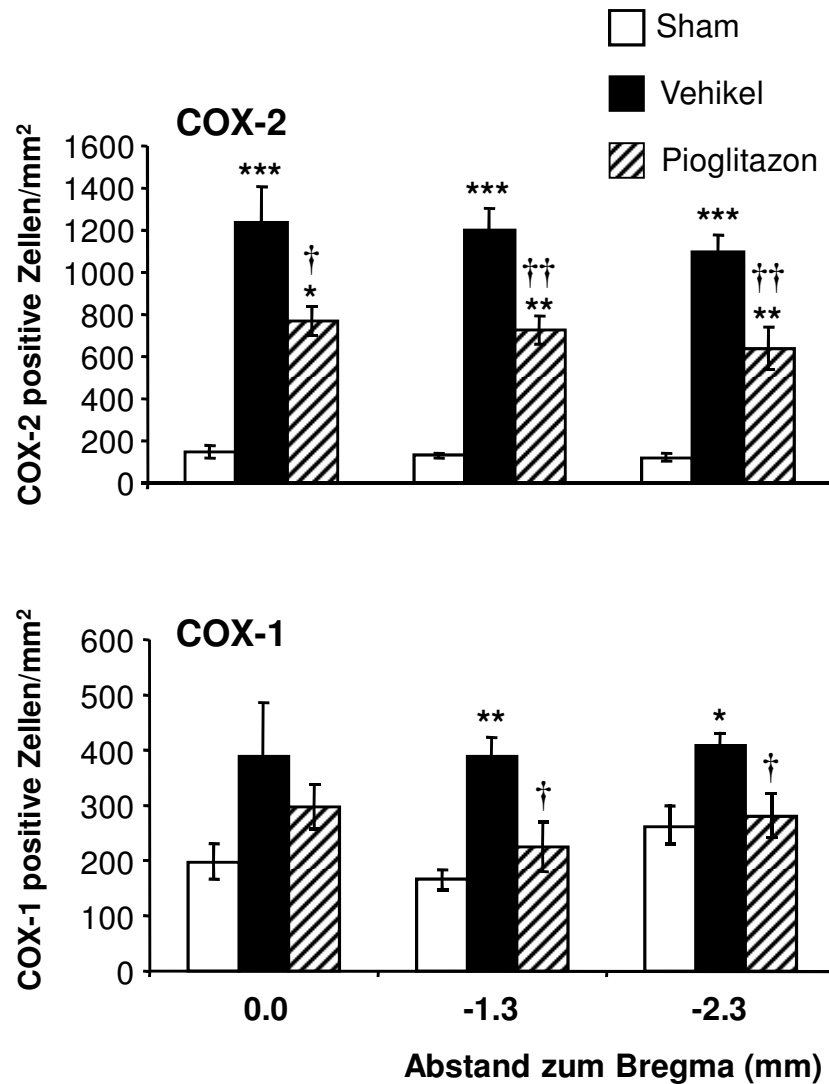


Abbildung 12. Zahl der COX-2- und COX-1 positiven Zellen im frontoparietalen Kortex 48 h nach MCAO. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse aus der immunhistochemischen Untersuchung aus drei verschiedenen Ebenen. Pioglitazon verringerte die Anzahl von COX-2 und COX-1 positiven Zellen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$: Statistischer Vergleich mit den sham-operierten Ratten. † $P < 0,05$; †† $P < 0,01$: Statistischer Vergleich mit den Vehikel-behandelten Tieren, errechnet mit ANOVA gefolgt von einem post-hoc Bonferroni Test.

Die Immunfluoreszenzuntersuchungen haben den Aufschluss über den Zelltyp erbracht, welcher die COX-2 im ischämischen kortikalen Gewebe exprimierten (Abbildung 13, 14). Die Kolokalisation der COX-2 mit dem neuronalen Marker NeuN und mit dem CD-68, einem Marker für die aktivierte Mikroglia/Makrophagen zeigte, das COX-2 hauptsächlich in ischämischen Neuronen und nur spärlich in Mikroglia/Makrophagen induziert wird (Abb. 13, 14).

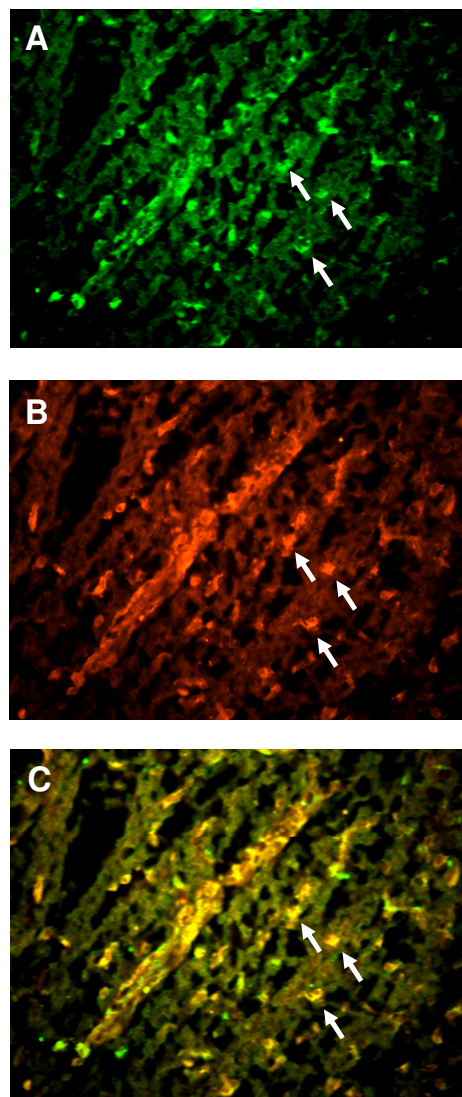


Abbildung 13. Expression von COX-2 in aktivierter Mikroglia/Makrophagen im peri-Infarktgebiet des frontoparietalen Kortex bei Vehikel behandelten Ratten. A) Färbung von CD-68 (grün), B) Färbung von COX-2 (rot), C) Kolokalisation von CD-68 mit COX-2 (gelb). COX-2 wurde in wenigen Mikroglia/Makrophagen induziert.

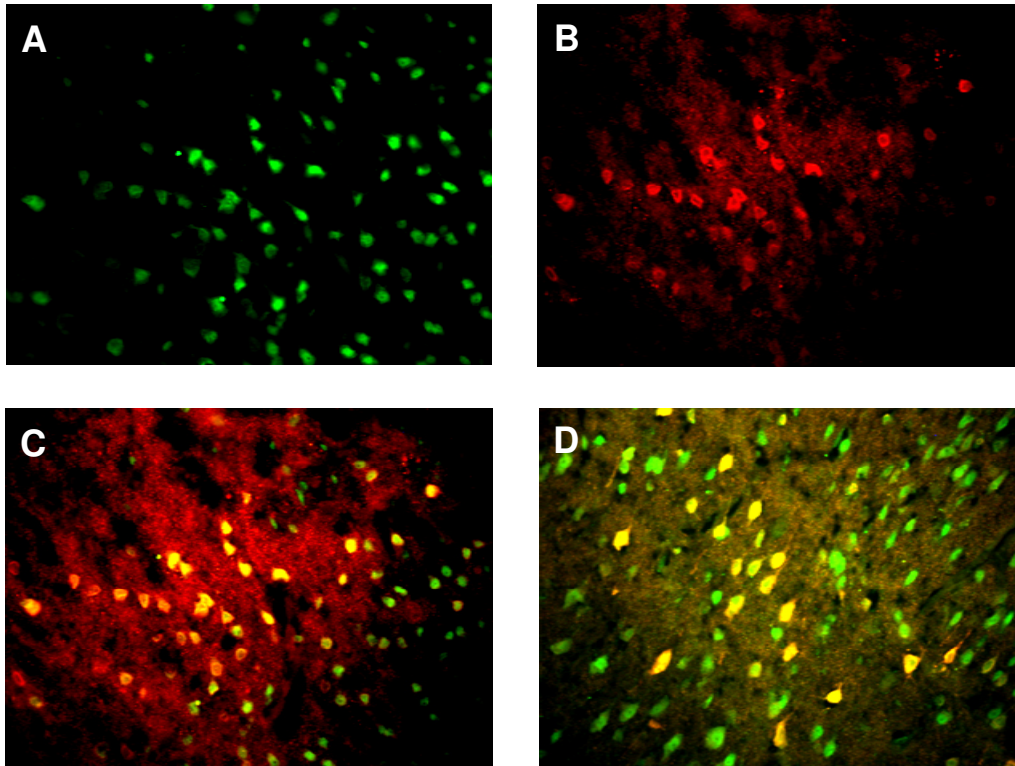


Abbildung 14. Expression von COX-2 in Neuronen im peri-Infarktgebiet des frontoparietalen Kortex bei Vehikel behandelten Ratten. A) Färbung von NeuN (grün), B) Färbung von COX-2 (rot), C) Kolokalisation von NeuN mit COX-2 (gelb) zeigt, dass in Vehikel-behandelten Ratten alle Neurone im Randgebiet des ischämischen Kerns COX-2 exprimieren. D) Kolokalisation von NeuN mit COX-2 (gelb) in Pioglitazon-behandelten Ratten zeigt, dass ungefähr in der Hälfte der Neurone im Randgebiet des ischämischen Kerns COX-2 induziert wird.

3.8 Primäre neuronale Zellkulturen

Die bislang veröffentlichten Daten deuten daraufhin, dass die protektiven Effekte der PPAR- γ Liganden auf die Neurone nach dem Schlaganfall indirekt, durch eine Unterdrückung der Aktivität von Makrophagen und aktivierter Mikroglia hervorgerufen werden (Kim et al., 2002). In der abschließenden Versuchsreihe untersuchten wir die Bedeutung der PPAR- γ Aktivierung in Neuronen hinsichtlich der Beteiligung an der Regulation der COX-2 Expression. Die Zellkulturen bestanden zu 10 – 20 % aus Astroglia und zu 80 – 90 % aus

Neuronen. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte, dass in nahezu allen primären Neuronen PPAR- γ exprimiert wird (Abbildung 15), wohingegen in Astrozyten nur in einem geringen Prozentsatz von < 25% der Zellen PPAR- γ induziert wird (Abbildung 16).

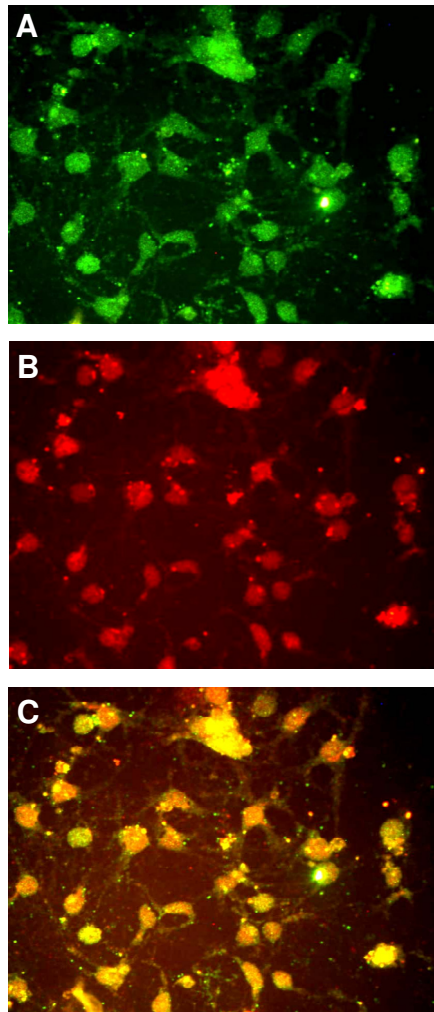


Abbildung 15. Expression des PPAR- γ in primären Neuronen.

A) Färbung von NeuN (grün), B) Färbung von PPAR- γ (rot), C) Kolokalisation von NeuN mit PPAR- γ (gelb) zeigt, dass alle primären Neurone den Rezeptor exprimieren.

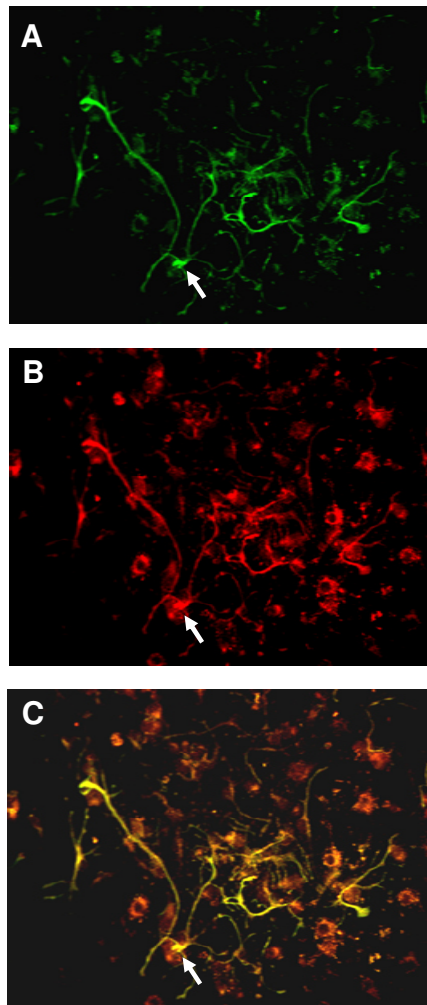


Abbildung 16. Expression des PPAR- γ in Astrozyten in neuronalen Zellkulturen. A) Färbung von Astrozyten (glial fibrillary acidic protein) (GFAP) (grün), B) Färbung von PPAR- γ (rot), C) Kolokalisation von GFAP mit PPAR- γ (gelb) zeigt, dass nur wenige Astrozyten den Rezeptor exprimieren (weißer Pfeil).

Die Behandlung primärer kortikaler Neurone mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) für 24 h führte zu einer erheblichen Schädigung der Zellen (durch oxidativen Stress) und einem Anstieg der COX-2 Expression (Abb.17). Die Wirkung von Pioglitazon auf die Induktion von COX-2 wurde in primären Neuronen untersucht, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden. Die Vorbehandlung mit Pioglitazon führte zu einer kompletten Hemmung der durch Wasserstoffperoxid-induzierten COX-2 Expression in Neuronen (Abbildung 18). Nach der Zugabe des selektiven PPAR- γ Antagonisten GW 9662 wurde die hemmende Wirkung von Pioglitazon auf die COX-2 Induktion vollständig aufgehoben. Dieses Ergebnis zeigt, dass der hemmende Effekt von Pioglitazon auf die durch Wasserstoffperoxid induzierte COX-2 Expression in primären Neuronen über den PPAR- γ vermittelt wird.

Die Abbildung 18 zeigt die Immunfluoreszenzuntersuchung der COX-2 Expression in primären kortikalen Neuronen, eine exemplarische Darstellung der Western-Blot-Analyse und die zusammengefassten Ergebnisse. ($F_{2,32} = 7,165$; $p < 0,001$). Unsere Daten zeigen deutlich, dass die durch oxidativen Stress induzierte COX-2 Expression durch Pioglitazon verringert werden konnte. Daraus lässt sich schließen, dass die neuroprotektiven Effekte von Pioglitazon auch über die PPAR- γ Aktivierung in geschädigten Neuronen vermittelt werden.

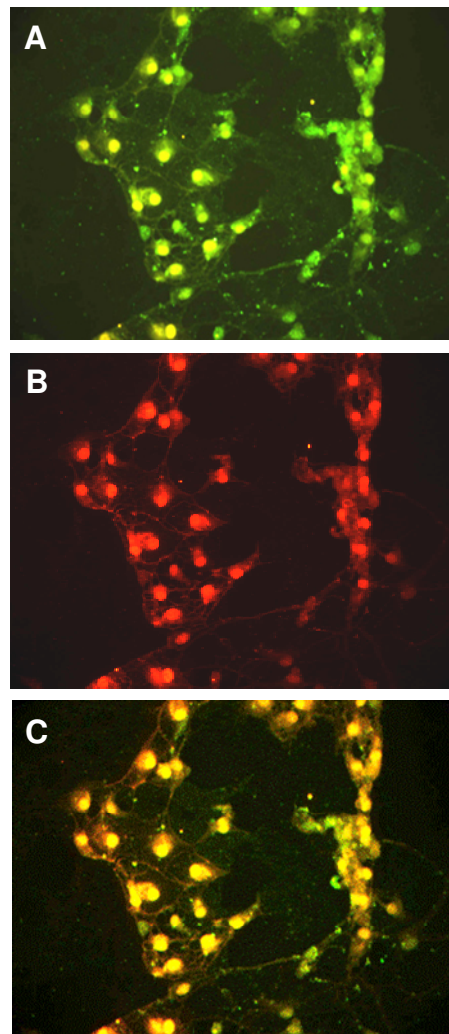


Abbildung 17. Die Auswirkung vom oxidativen Stress auf die Induktion von COX-2 in primären kortikalen Neuronen. A) Färbung für NeuN (Neurone) (grün), B) Färbung für COX-2 (rot), C) Kolokalisation von NeuN mit COX-2 zeigt, dass eine Inkubation mit Wasserstoffperoxid in nahezu allen Neuronen eine starke COX-2-Expression induziert.

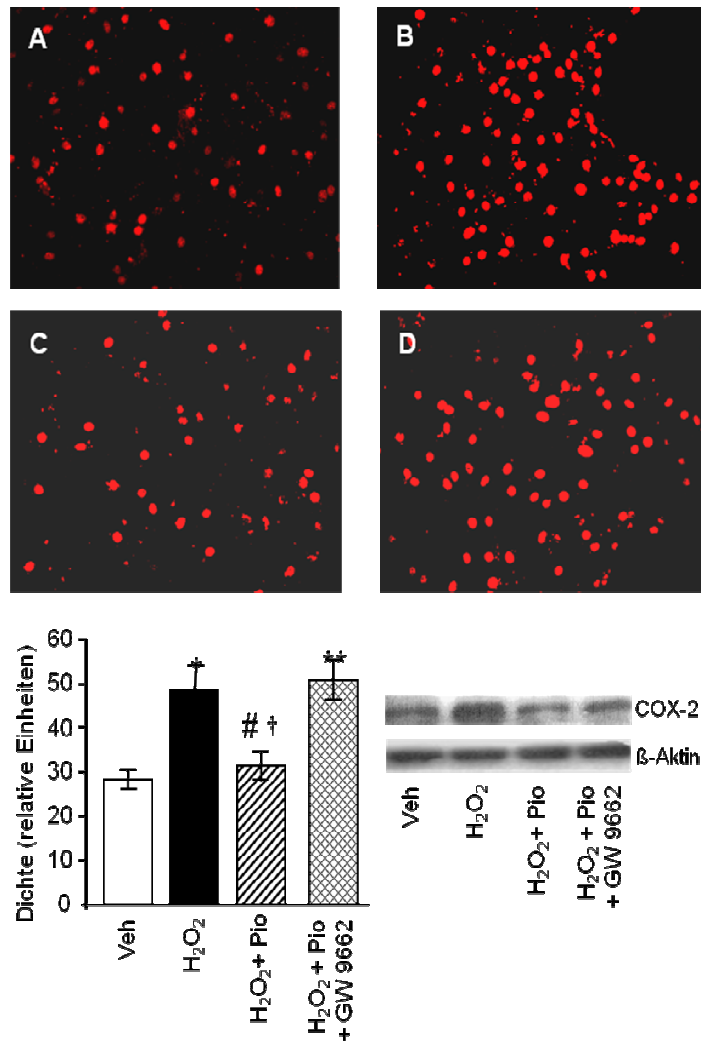


Abbildung 18. Die Aktivierung von PPAR- γ in primären neuronalen Zellen reduziert die COX-2 Induktion nach einem oxidativen Stress. In den Ausschnitten A-D sind COX-2 positive Neurone rot angefärbt. Im Vergleich zur Inkubation mit Vehikel (A), führte eine Inkubation der Neurone mit 100 μ M H₂O₂ zu einer deutlich erhöhten Zahl der Zellen, die COX-2 exprimieren (B). Eine Vorbehandlung der Zellen mit Pioglitazon reduzierte die Zahl der COX-2-positiven Neurone (C). Eine Zugabe des selektiven PPAR- γ Antagonisten GW 9662 hob den Effekt von Pioglitazon vollständig auf (D). Unten: Die Western-Blot-Analyse der COX-2 Expression in primären Neuronen, nach Hinzufügen von H₂O₂. Abgebildet ist die Intensität der Banden (im Verhältnis zu β -Aktin). Verglichen werden eine mit Vehikel-behandelte Zellkultur (Kontrolle), eine mit Wasserstoffperoxid-behandelte Zellkultur (H₂O₂), eine mit Wasserstoffperoxid-behandelte Zellkultur, die mit Pioglitazon vorbehandelt wurde (H₂O₂ + Pio) und eine Zellkultur, die zusätzlich zu Pioglitazon mit dem selektiven PPAR- γ Antagonisten GW 9662 vorbehandelt wurde und dem oxidativen Stress ausgesetzt wurde (H₂O₂ + Pio + GW 9662). Der statistische Vergleich zur Kontrolle (Vehikel-Behandlung): * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; zu der mit Wasserstoffperoxid-behandelten Gruppe: # $P < 0,05$ und zu der mit Wasserstoffperoxid-behandelten und mit Pioglitazon und GW 9662 vorbehandelten Gruppe: † $P < 0,05$ wurde mit ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test berechnet.

4 Diskussion

Unsere Daten zeigen, dass eine Aktivierung des PPAR- γ im Gehirn zu einer Verringerung des neurologischen Defizits und der Infarktgröße nach einer fokalen zerebralen Ischämie bei der Ratte führt. In der frühen Phase nach dem ischämischen Insult wird in ischämischen Neuronen der PPAR- γ exprimiert, das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α induziert und die COX-2 Expression erhöht. Aktivierung des PPAR- γ unterdrückt die Induktion des Zytokins TNF- α und die Expression von COX-2. Diese Mechanismen reduzieren die post-ischämische Inflammation, den neuronalen Zelltod und tragen maßgeblich zur Neuroprotektion bei.

Die Versuche wurden an Ratten durchgeführt, deren zerebrovaskuläre Anatomie der des Menschen ähnlich ist. Die meisten Schlaganfallstudien wurden bislang an Ratten durchgeführt. Wir haben ein Modell angewandt, bei dem eine große Hirnarterie (Arteria cerebri media) mittels eines Monofilamentes verschlossen und nach einem Zeitintervall von 90 min wiedereröffnet wurde. Frühere Studien zeigten, dass eine 90 minütige Okklusionszeit zu einem großem Schlaganfall und erheblichen motorischen und sensorischen Ausfällen führte. Bei kürzeren Okklusionszeiten, z.B. 30 min, wurden nur geringfügige neuronale Ausfälle beobachtet, die Okklusionszeiten über 90 min steigerten dagegen deutlich die Mortalitätsrate (McAuley, 1995).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es wenige Stunden nach MCAO zu einem steilen Anstieg der PPAR- γ – positiven Zellen in der ischämischen Kortexregion kam. Der steile Abfall der Anzahl von PPAR- γ positiven Zellen binnen 48 h nach MCAO korreliert mit der erhöhten Akkumulation von aktivierten Mikroglia/Makrophagen im ischämischen Gewebe (Bernardo et al., 2000). Die Induktion von TNF- α zu diesem Zeitpunkt (siehe unten) könnte auch eine Rolle spielen, denn das Zytokin ist in der Lage die Expression von PPAR- γ zu hemmen (Desvergne and Wahli, 1999).

Das Vorkommen des PPAR- γ in verschiedenen Regionen des ZNS und seine Expression in Neuronen und Gliazellen wurden bereits beschrieben (Cullingford et al., 1998; Bernardo et al., 2000; Cristiano et al., 2001; Moreno et al., 2004). Übereinstimmend mit diesen Daten wurde der PPAR- γ vor allem in aktivierten Mikrogliazellen / Makrophagen und in Neuronen exprimiert. In der ischämischen Penumbra wurde ein erhöhter Spiegel von PPAR- γ -mRNA nachgewiesen (Ou et al., 2006; Zhao et al., 2006). Gleichzeitig ist die biologische Aktivität des Rezeptors vermindert. Die Behandlung mit einem PPAR- γ Agonisten normalisiert vollständig seine Bindungsaffinität zur DNA (Luo et al., 2006; Ou et al., 2006). Vor kurzem haben wir berichtet, dass der PPAR- γ Rezeptor in dem ischämischen Gewebe am Rande des Kerns vermehrt induziert wird und die icv Behandlung mit Pioglitazon die erhöhte PPAR- γ -

Expression weiter gesteigert hat (Patzner et al., 2008). Die PPAR- γ Agonisten induzieren die Expression des Rezeptors im ischämischen Gewebe und erhöhen gleichzeitig dessen DNA-Bindungsaktivität (Luo et al., 2006; Patzner et al., 2008). Besonders wichtig für die Neuroprotektion scheint die in dieser Arbeit beobachtete Induktion des PPAR- γ in Neuronen zu sein. Wir gehen davon aus, dass die Überexpression des PPAR- γ und dessen Aktivierung mit Pioglitazon die beschädigten Neuronen schützt, deren Apoptose verhindert und entscheidend zur Neuroprotektion beiträgt.

Über die neuroprotektiven Effekte einer systemischen Behandlung mit PPAR- γ Agonisten bei zerebralen Ischämie wurde mehrfach berichtet (Culman et al. 2007, Yi et al. 2007; Heneka et al., 2000). Die Ischämie-induzierte Überexpression von Adhäsionsmolekülen an den Endothelzellen stimuliert die Migration von Granulozyten und Makrophagen ins ischämische Gewebe, welche die Entzündungsprozesse aktivieren und verstärken. Die PPAR- γ Agonisten hemmen die Expression von Adhäsionsmolekülen, den oxidativen Stress in Endothelzellen und die Freisetzung von Endothelin-1 aus den Endothelzellen und verhindern somit eine lokale Vasokonstriktion, welche zur Verringerung der zerebralen Durchblutung in der Penumbra führen kann. Die PPAR- γ Agonisten stimulieren zudem die NO-Produktion und die Expression der neuronalen NO-Synthase (Dobrian et al., 2004). Pioglitazon überwindet nur mäßig die Blut-Hirn-Schranke (Maeshiba et al., 1997). Während und nach einer Gehirnschämie wird die Blut-Hirn-Schranke durchlässig und Pioglitazon kann deshalb effektiv ins Gehirngewebe penetrieren und Effekte auslösen. Bei einer systemischen Behandlung mit Pioglitazon und anderen synthetischen PPAR- γ Agonisten tragen sowohl die peripheren als auch die zentralen Effekte zu dem besseren Ausgang nach einer zerebralen Ischämie bei. Um die Relevanz der zentralen PPAR- γ für die Neuroprotektion nach einem ischämischen Schlaganfall zu untersuchen, wurde Pioglitazon in unseren Versuchen icv infundiert. Wie schon erwähnt, steigert Pioglitazon die Ischämie-induzierte PPAR- γ Überexpression im ischämischen Gewebe. Wir haben zeigen können, dass die in diesen Versuchen verwendete Dosis von Pioglitazon das ischämische kortikale Gewebe ausreichend saturiert und die Expression des PPAR- γ erhöht (Patzner et al., 2008). Über die günstigen Effekte der Aktivierung von zentralen PPAR- γ s auf die schädlichen Auswirkungen nach einer zerebralen Ischämie wird auch in dieser Arbeit berichtet. Die mit Pioglitazon behandelten Tiere zeigten ein reduziertes Schlaganfallvolumen sowie ein geringeres Hirnödem und geringere sensorische Ausfälle. Diese Effekte wurden nicht über die Wirkung an Endothelzellen vermittelt, denn es wurden nur geringe Dosen des PPAR- γ Agonisten icv infundiert. Darüber hinaus wurden keine Unterschiede im regionalen zerebralen Blutfluss

zwischen Vehikel- und Pioglitazon-behandelten Tieren festgestellt. Die günstigen Effekte des PPAR- γ Agonisten wurden ausschließlich über zentrale Mechanismen ausgelöst. Die post-ischämische Inflammation spielt in der Pathogenese der zerebralen Ischämie eine entscheidende Rolle (Dirnagl et al., 1999). Eine zerebrale Ischämie aktiviert die Transkription und die Freisetzung pro-inflammatorischer Gene im ischämischen Gewebe. Die Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , TNF- α und IL-6 fördert die Akkumulation von Granulozyten und Makrophagen im ischämischen Gehirngewebe, initiiert die Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren und erhält die post-ischämische Inflammation aufrecht, die zum Absterben der Neurone maßgeblich beiträgt. Die Behandlung mit PPAR- γ Agonisten hemmt die Akkumulation der aktivierten Mikroglia/Makrophagen und folglich die Expression und Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine und Mediatoren, z.B. IL-1 β oder IL-6 (Sundararajan et al., 2005; Zhao et al., 2005; Collino et al., 2006; Luo et al., 2006; Tureyen et al., 2007). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Pioglitazon die Akkumulation von Mikroglia/ Makrophagen im Randbereich des ischämischen zerebralen Kortex verringert und die Expression von IL-1 β und IL-6 unterdrückt (Zhao et al., 2005; Patzer et al., 2008; Glatz et al., 2010). Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung der Bedeutung des PPAR- γ in ischämischen Neuronen, im Hinblick auf die Expression von TNF- α und COX-2. In unserem Versuchsvorhaben haben wir den Protein-Spiegel von TNF- α und COX-2 und nicht die entsprechenden mRNAs gemessen. Während der Gehirnhypoxie können große Mengen von mRNAs produziert werden, welche aber nicht in die entsprechenden Proteine umgeschrieben werden (Roux-Lombard, 1998). Zum zweiten haben wir die Protein-Spiegel und die Anzahl der TNF- α - und COX-2-positiven Zellen in einem genau definierten Ischämie-Randgebiet des frontoparietalen Kortex bestimmt. In vielen Studien wurde die Expression von mRNAs im ganzen ischämischen Kortex untersucht, der außer dem ischämischen Kern auch gesundes Gewebe enthielt. In unseren Versuchen wurden auch die an den ischämischen Kern angrenzenden Zellen im frontoparietalen Kortex quantifiziert, welche TNF- α oder COX-2 exprimieren.

Die icv Behandlung mit Pioglitazon hat die Überexpression von TNF- α im Randgebiet des ischämischen Kerns effektiv inhibiert. Über eine signifikante Erhöhung der TNF- α mRNA schon 1 h nach Beginn der Ischämie und über den ersten Spitzenwert des TNF- α Proteins nach 2 bis 6 h wurde bereits berichtet (Hallenbeck et al., 2002). In dieser Arbeit wurde eine erhöhte Induktion des Zytokins und eine starke Akkumulation von TNF- α -positiven Neuronen im Randgebiet des ischämischen Kerns 24 h nach MCAO festgestellt und erstmals

gezeigt, dass die Aktivierung der zerebralen PPAR- γ mit Pioglitazon auch die Akkumulation von TNF- α -positiven Zellen sehr effektiv unterdrückt.

TNF- α ist ein potenter Entzündungsmediator mit vielseitiger Wirkung im ischämischen Gewebe. Die Bindung von TNF- α an den TNFR1 und nachfolgende Aktivierung von NF- κ B initiiert die Transkription von zahlreichen inflammatorischen Zytokine und deren Rezeptoren, bewirkt eine anhaltende Aktivierung von c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und kann den programmierten neuronalen Zelltod auslösen (Wang et al., 2007). Hosomi et al. (2005) haben berichtet, dass eine Senkung des TNF- α Spiegels im ischämischen Gewebe mittels neutralisierender Antikörper eine Reduktion der Infarktgröße und des Infarktödems nach Ischämie bewirkte. TNF- α ist ein potenter Induktor der Produktion von Adhäsionsmolekülen an den Endothelzellen, welche die Anheftung und die Migration von Makrophagen und Leukozyten ins ischämische Gewebe fördern (Dirnagl et al., 1999). Eine systemische Behandlung mit PPAR- γ Agonisten vermindert die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen (Luo et al., 2006; Sundararajan and Landreth, 2004). Da in unseren Experimenten eine geringe Dosis von Pioglitazon icv infundiert wurde, konnte Pioglitazon keinen Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ausüben. Vielmehr hängt die reduzierte Akkumulation der Entzündungszellen nach icv Behandlung mit Pioglitazon (Zhao et al., 2005) mit der verminderten Produktion und Freisetzung von TNF- α aus beschädigten Neuronen zusammen.

Der PPAR- γ vermag die Expression von TNF- α unabhängig von dessen Bindung an die Promotorregion des Gens zu hemmen. Die Transkription des TNF- α - Gens wird über Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B und c-Jun kontrolliert (Liu et al., 2000). Einerseits konkurriert der aktivierte PPAR- γ mit den Transkriptionsfaktoren um die Ko-Aktivatoren, welche deren Bindung an die entsprechenden DNA-Regionen ermöglichen, andererseits hemmt der Rezeptor die Phosphorylierung von verschiedenen Kinasen, wie der JNK, welche die Transkriptionsfaktoren, in diesem Falle c-Jun phosphorylieren und aktivieren (Abdelrahman et al., 2005). Als eine weitere Wirkweise der PPAR- γ wird die Transrepression beschrieben, ein Mechanismus, über den die aktivierten PPAR- γ die Transkription von Genen in Makrophagen und anderen Entzündungszellen hemmen können. Hierbei kommt es zu einer Interaktion des aktivierten PPAR- γ mit dem Ko-Repressorkomplex des Transkriptionsfaktors und die Dissoziation des Ko-Repressors sowie der Umtausch gegen einen Ko-Aktivator werden verhindert (Ricote und Glass, 2007).

Die Transrepression wurde für NF- κ B in Makrophagen nachgewiesen (Pascual et al., 2005), in Neuronen wurde dieser Mechanismus bislang nicht beschrieben. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Aktivierung des PPAR- γ zu einer verminderten Induktion von COX-2 führt. COX-2 wird in ischämischen neuronalen Gewebe gebildet und spielt eine entscheidende Rolle für den Zelltod (Graham und Hickey, 2003). Nach einem Schlaganfall wird COX-2 im ischämischen neuronalen Gewebe sehr schnell induziert. Ein Anstieg der COX-2 mRNA wurde bereits nach 6 h detektiert, der höchste Spiegel wurde nach 12 h erreicht (Nogawa et al., 1997; Collaco-Moraes et al., 1996; Yokota et al., 2004). In unseren Versuchen war die Zahl der COX-2 positiven Zellen im kortikalen ischämischen Gewebe bereits 12 h nach MCAO erhöht und stieg bis zu 48 Stunden nach MCAO kontinuierlich an. Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigten, dass COX-2 hauptsächlich in Neuronen und nur zu einem geringeren Anteil in Mikrogliazellen vorkam. Nach einem ischämischen Schlaganfall wird COX-2 auch im menschlichen Hirngewebe vermehrt exprimiert (Iadecola et al., 1999).

Eine Überexpression und erhöhte COX-2 Aktivität hat hauptsächlich in Neuronen verheerende Wirkung und führt letztlich zum neuronalen Zelltod (Mattson et al., 2000). Dabei spielt die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen eine entscheidende Rolle, obwohl auch die erhöhte Bildung von Prostaglandinen zum neuronalen Tod beitragen kann (Iadecola und Alexander, 2001). Eine überhöhte Stimulation des NMDA-Rezeptors in Neuronen, z.B. während der Streudepolarisierung (*spreading-depression*) führt zu einer gesteigerter COX-2 Expression über intrazellulären Calcium Anstieg, zur Aktivierung von JNK und p38 MAPK und zur Bindung von c-Jun und CCAAT/*enhancer-binding protein* (C/EPB) an die COX-2 Promotorregion (Koistinaho and Chan, 2000). Die Überexpression von COX-2 führt zum neuronalen Zelltod nach einer Stimulation primärer kortikaler Neurone mit NMDA (Hewett et al., 2000). Selektive COX-2 Antagonisten reduzieren das Infarktvolumen und es wurde gezeigt, dass COX-2 knock-out Mäusen weniger anfällig gegen neuronalen Schaden nach einer fokalen zerebralen Ischämie sind (Nogawa et al., 1997, Sasaki et al., 2004). Im Hinblick auf diese Daten wirkt die Verminderung der Ischämie-induzierten Expression von COX-2 durch die Behandlung mit Pioglitazon neuroprotektiv und verhindert den neuronalen Zelltod. Außer dem ischämischen Kern und der Penumbra sind auch Neurone in anderen Gehirnregionen, in denen keine Blutflussreduktion während des ischämischen Insults vorhanden war, schwer beschädigt oder sie sterben ab. Zum Beispiel werden im Hippocampus nach MCAO zahlreiche Gene aktiviert, welche die Transkriptionsfaktoren für c-Fos, c-Jun und COX-2 kodieren. Die Aktivierung dieser Gene erfolgt sehr wahrscheinlich über

exzitatorische Mechanismen. Eine lang andauernde *spreading-depression* im Kortex führt zur anhaltenden Aktivierung des Hippocampus (Sharp et al., 2000). Die Vorbehandlung mit Pioglitazon verhinderte die COX-2-Induktion im ipsilateralen Hippocampus. Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnten wir vor kurzem zeigen, dass eine icv Behandlung mit Pioglitazon die Degeneration und den Tod der Neurone in der Substantia nigra nach MCAO verhindert. (Zuhayra et al., 2011). Diese Ergebnisse zeigen, dass Pioglitazon die Progression des Hirnschadens und den neuronalen Tod sowohl in ischämischen Gehirnregionen als auch in Gebieten, die nicht direkt von der Ischämie betroffen waren, zu verhindern vermag.

PPAR- γ Liganden regulieren die inflammatorischen Prozesse über PPAR- γ abhängige und unabhängige Mechanismen (Chawla et al., 2001, Kielian und Drew, 2003; Sundararajan und Landreth, 2004). Die Bedeutung des PPAR- γ für die Reduktion der neuronalen COX-2 Expression wurde an primären kortikalen Neuronen untersucht, welche oxidativem Stress ausgesetzt worden waren. Primäre kortikale Neurone exprimieren PPAR- γ . Eine Inkubation der Neurone mit Wasserstoffperoxid (oxidativer Stress) führte zu einem starken Anstieg der COX-2 Expression. Die Vorbehandlung mit Pioglitazon verringerte die COX-2-Induktion und die Anzahl der COX-2 positiven Neurone in der Zellkultur. Dieser Effekt wird über PPAR- γ vermittelt, denn er konnte durch die Applikation des selektiven PPAR- γ Antagonisten GW 9662 vollständig aufgehoben werden. Diese Daten postulieren einen Zusammenhang zwischen den neuroprotektiven Effekten von Pioglitazon und der Reduktion der COX-2 Expression und folglich des neuronalen oxidativen Stresses. In Zellkulturen, die sowohl Neurone als auch Mikrogliazellen enthielten, inhibierten PPAR- γ Agonisten den durch Lipopolysaccharide vermittelten neuronalen Zelltod, indem sie die Bildung und Freisetzung neurotoxischer Stoffe aus Mikrogliazellen unterdrückten (Kim et al., 2002). Die Autoren behaupten, dass die PPAR- γ Liganden indirekt, durch die Wirkung auf Monozyten und Mikroglia, den neuronalen Zelltod verhindern. Dagegen zeigen unsere Daten deutlich, dass Neurone PPAR- γ exprimieren und die Aktivierung des Rezeptors Neurone vor der COX-2 Überexpression und dem oxidativen Stress schützten.

Pioglitazon verringerte auch die Zahl der COX-1-positiven Zellen im Randbereich des ischämischen Kortex. Im Gegensatz zu COX-2 wird die Rolle von COX-1 in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls kontrovers diskutiert (Graham und Hickey, 2003, Schwab und Schluesener, 2003). COX-1 scheint eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des zerebralen Blutflusses zu spielen, indem die Enzymaktivierung in Endothelzellen eine Vasodilatation bewirkt (Niwa et al., 2001). Ein Ischämischer Schlaganfall verstärkte bei COX-1 knock-out Mäusen den entstehenden Gewebeschaden. Diskutiert wird

ein ausgeprägtes Absinken des regionalen Blutflusses während des ischämischen Insults (Iadecola et al., 2001). Entsprechend führte ein Transfer von rekombinanten COX-1 Genen in den Ventrikel einer Ratte zu einem erhöhten Prostaglandin PGI-2 Spiegel und zu einer Abnahme von Leukotrienen und folglich zur Verringerung der Infarktgröße (Lin et al., 2002). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten Candelario-Jalil et al. (2003) zeigen, dass COX-1 den neuronalen Schaden verstärkt und den neuronalen Zelltod nach globaler zerebraler Ischämie induziert. Die beobachtete Hemmung der COX-1 Expression kann deshalb zu den neuroprotektiven Effekten von Pioglitazon beitragen.

Die Reduktion der COX-2- und TNF- α Expression und Verminderung des oxidativen Stresses beim Schlaganfall durch Pioglitazon tragen wesentlich zu neuroprotektiven Effekten des PPAR- γ Agonisten bei. Thiazolidindione verringern den Glukosespiegel, indem sie die Aufnahme von Insulin in die Zellen erleichtern, verringern die endotheliale Dysfunktion, reduzieren den Blutdruck und verringern Dyslipoproteinämien (Vasudevan et al., 2004). Dormandy et al. (2005) haben gezeigt, dass Pioglitazon die Gesamtsterblichkeit von Typ 2 Diabetikern mit einem Herzinfarkt oder Schlaganfall bis zu 16 % reduzierte. Im Jahr 2012 wurde eine präklinische Studie an einer großen Anzahl von Ratten veröffentlicht (Culman et al., 2012). In dieser Studie wurde Pioglitazon in der Reperfusionphase 3 h nach dem Beginn des ischämischen Insults systemisch verabreicht. Die Therapie zeigte eine signifikante Reduktion des Schlaganfallvolumens und der neurologischen Defizite, Verminderung der Akkumulation von Mikroglia/Makrophagen und Neurodegeneration sowie eine Stimulation der Neuroregeneration im Randbereich des ischämischen Kortex (Culman et al., 2012). Bei Langzeittherapie mit Pioglitazon (Monate und Jahre) wurden Nebenwirkungen, wie z. B. Herzinsuffizienz, Ödembildung und eine Gewichtszunahme beschrieben. Unsere Daten und Ergebnisse anderer Untersuchungen legen nahe, dass die Behandlung mit Pioglitazon nach einem zerebralen Insult sinnvoll erscheint. Die größte Zellschädigung zeigt sich in den Stunden und Tagen nach dem zerebralen Insult. Die Behandlung von Patienten mit Pioglitazon während dieses Zeitraums könnte zur Reduktion der Gehirnläsion und Verbesserung des neurologischen Status beitragen ohne Nebenwirkungen auszulösen. Neue, nebenwirkungsfreie PPAR- γ Agonisten, welche nach systemischer Gabe einen höheren Wirkspiegel im ZNS aufbauen, könnten in der zukünftigen Therapie des ischämischen Schlaganfalls eine wichtige Rolle spielen.

5 Zusammenfassung

Inflammatorische Prozesse und eine erhöhte Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) sowie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) im neuronalen Gewebe infolge einer zerebralen Ischämie verstärken den ischämischen Gewebeschaden und führen zu einem gesteigerten neuronalen Zelltod. In dieser Arbeit untersuchen wir die Rolle des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors- γ (PPAR- γ) bei der COX-2 Expression im ischämischen frontoparietalen Kortex der Ratte nach einer fokalen zerebralen Ischämie mittels Western-Blot-Analyse, immunhistochemischer Untersuchungen, und Immunfluoreszenzfärbungen.

Die fokale zerebrale Ischämie erhöhte im ischämischen Randgebiet des frontoparietalen Kortex die Anzahl der Zellen, die sich positiv für den PPAR- γ , für die COX-2- und COX-1 anfärben und führte zu einer Überexpression von COX-2 und dem Zytokin TNF- α . Die höchste Anzahl an PPAR- γ wurde 12 h nach der zerebralen Ischämie beobachtet. Der PPAR- γ konnte sowohl in Mikrogliazellen als auch in Neuronen nachgewiesen werden. Ein signifikanter Anstieg der COX-2 positiven Zellen wurde bereits nach 12 Stunden registriert und erreichte das Maximum 48 Stunden nach der Induktion einer Gehirnschämie. COX-2 wurde fast ausschließlich in Neuronen exprimiert.

Die intrazerebroventrikuläre Behandlung mit Pioglitazon, einem PPAR- γ Agonisten über einen Zeitraum von 5 Tagen vor und 2 Tagen nach einem Schlaganfall führte zu einer verminderten Expression von COX-2 und TNF- α im ischämischen kortikalen Gewebe und im ipsilateralen Hippocampus. Der Ischämie-induzierte Anstieg der COX-2 und COX-1 positiven Zellen wurde gehemmt. Pioglitazon reduzierte das Schlaganfallvolumen und das Hirnödem 24 h nach dem ischämischen Insult und verbesserte signifikant den neurologischen Status der Tiere.

An primären Neuronen, die den PPAR- γ exprimieren, wurde die Rolle des Rezeptors bei der Regulation von COX-2 Expression unter oxidativem Stress untersucht. Eine Inkubation der primären Neurone mit Wasserstoffperoxid induzierte eine Überexpression von COX-2. Pioglitazon verminderte deutlich die Induktion von COX-2 in der Zellkultur. Dieser Effekt konnte durch den selektiven Antagonisten am PPAR- γ GW 9662 vollständig aufgehoben werden und ist deshalb über die Aktivierung von PPAR- γ vermittelt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Pioglitazon über die Aktivierung der neuronalen PPAR- γ Rezeptoren die Induktion von TNF- α und COX-2 im ischämischen neuronalen Gewebe effektiv hemmt und folglich die post-ischämische Inflammation unterdrückt und deutet auf

den neuronalen PPAR- γ als zentralen Mechanismus bei den neuroprotektiven Wirkungen von Pioglitazon nach einem ischämischen Schlaganfall hin.

6. Literaturverzeichnis

Abdelrahman, M., Sivarajah, A., Thiemermann, C. (2005): Beneficial effects of PPAR- γ ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovasc. Res.*, 65: 772-781

Bederson, J., Pitts, L.H., Tsuji, M., Nishimura, M.C., Davis, R.L., Bartkowski, H. (1986): Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17: 472-476

Bernardo, A., Levi, G., Minghetti, L. (2000): Role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) and its natural ligand 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 in the regulation of microglial functions. *Eur. J. Neurosci.*, 12: 2215-2223

Breidert, T., Callebert, J., Heneka, M. T., Landreth, G., Launay, J. M., Hirsch, E. C. (2002): Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, 82: 615-624

Bordet, R., Ouk, T., Petrault, O., Gele, P., Laprais, M., Deplanque, D., Durriez, P., Staels, B., Fruchart, J.C., Bastide, M. (2006): PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochemical Society*, 34:1341-1346.

Candelario-Jalil, E., Gonzales-Falcon, A., Garcia-Cabrera, M., Alvarez, D., Al-Dalain, S., Martinez, G., Leon, O. S., Springer, J. E. (2003): Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. *J. Neurochem.*, 86: 545-555

Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., Simmons, D. L. (2002): COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 13926-13931

Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P., Evans, R. M. (2001): PPAR-gamma dependant and independant effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat. Med.*, 7: 48-52

Choi, D. W. (1996): Ischemia-induced apoptosis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 6: 667-672

Collaco-Moraes, Y., Aspey, B., Harrison, M., de Belleruche, J. (1996): Cyclo-oxygenase-2 mesenger RNA induction in focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 16: 1366-1372

Collino, M., Aragno, M., Mastrocola, R., Gallicchio, M., Rosa, A.C., Dianzani, C., Danni, O., Thiemermann, C., Fantozzi, F. (2006): Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR- γ agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur. J. Pharmacol.*, 530:70-80

Cristiano, L., Bernardo, A. Ceru, M. P. (2001): Peroxysom proliferator-activated receptors (PPARs) and peroxysomes in rat cortical and cerebellar astrocytes. *J. Neurocytol.*, 30: 671-683

Cullingford, T. E., Bhakoo, K., Peuchen, S., Dolphin, C. T., Patel, R., Clark, J. B. (1998): Distribution of mRNAs encoding the peroxysome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J. Neurochem.*, 70: 1366-1375

Culman, J., Zhao, Y., Gohlke, P., Herdegen, T. (2007): PPAR- γ , therapeutic target for ischemic stroke. *Trends Pharmacol Sci.*, 28:244-249

Culman, J., Nguyen-Ngoc, M., Glatz, T., Gohlke, P., Zhao, Y. (2012): Treatment of rats with pioglitazone in the reperfusion phase of focal cerebral ischemia: a preclinical stroke trial. *Exp. Neurol.*, 238:243-253

Desvergne, B. Whali, W. (1999): Peroxysom proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.*, 20: 649-688

Dirnagel, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. A. (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.*, 22: 391-397

Dobrian, A. D., Schriver, S. D., Khraibi, A. A., Prewitt, R. L. (2004): Pioglitazon prevents hypertension and reduces oxidative stress in diet-induced obesity. *Hypertension.*, 43: 48-56

Dormandy, J. A., Charbonnel, B., Eckland, D. J. A., Erdmann, E., Massi-Benedetti, M., Moules, I. K., Skene, A. M., Tan, M. H., Lefebvre, P. J., Murray, G. D. et al. (2005): Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial in macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet.*, 366: 1279-1289

Feinstein, D. L. (2003): Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptor agonists for neurological disease. *Diabetes Technol. Ther.*, 5: 67-73

Garcia, J.H., Wagner, S., Liu, K.F., Hu, X.J. (1995): Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 26: 627-635

Glatz, T., Stöck, I., Nguyen-Ngoc, M., Gohlke, P., Herdegen, T., Culman, J., Zhao, Y. (2010): Peroxisome-proliferator-activated receptors γ and peroxisome-proliferator-activated receptors α and the regulation of interleukin 1 receptor antagonist expression by pioglitazone in ischaemic brain. *J. Hypertension*, 28:1488-1497

Graham, S. H., Hickey, R. W. (2003): Cyclooxygenases in central nervous system diseases: a special role for cyclooxygenase-2 in neuronal cell death. *Arch. Neurol.*, 60: 628-630

Hallenbeck, J. M. (2002): The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat. Med.*, 8:1363-1368

Heneka, M. T., Feinstein, D. L., Galea, E., Gleichmann, M., Wullner, U., Klockgether, T. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma protect cerebellar granule cells from cytokine-induced apoptotic cell death by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J. Neuroimmunol.*, 100: 156-168

Heneka, M. T., Klockgether, T., Feinstein, D. L. (2000): Peroxisom proliferator-activated receptor-gamma ligand reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo. *J. Neurosci.*, 20: 6862-6867

Hewett, S. J., Uliasz, T. F., Vidwans, A. S., Hewett, J. A. (2000): Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 293: 417-425

Hosomi, N., Ban, C. R., Nay, T., Takahashi, T., Gao, P., Song, X-y. R., Kohno, M. (2005): Tumor necrosis factor- α neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 25: 959-967

Hossmann, K. A. (2006): Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol. Neurobiol.*, 26: 1057-1083

Iadecola, C., Alexander, M. (2001): Cerebral ischemia and inflammation. *Curr. Opin. Neurol.*, 14: 89-94

Iadecola, C., Forster, C., Nogawa, S., Clark, H. B., Ross, M. E. (1999): Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia. *Acta Neuropathol. (Berlin)*, 98: 9-14

Iadecola, C., Niwa, K., Nogawa, S., Zhao, X., Nagayama, M., Araki, E., Morhan, S., Ross, M. E. (2001): Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98: 1294-1299

Iadecola, C., Sugimoto, K., Niwa, K., Kkazama, K., Ross, M. E. (2001): Increased susceptibility to ischemic brain injury in cyclooxygenase-1-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 21: 1436-1441

Kielian, T., Drew, P. D. (2003): Effects of peroxysome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation. *J. Neurosci. Res.*, 71: 315-325

Kim, E., Kwon, K. J., Park, J. Y., Lee, S. H., Moon, C. H., Baik, E. J. (2002): Effects of peroxysome proliferator-activated receptor agonists on LPS-induced neuronal death in mixed cortical neurons: associated with iNOS and COX-2. *Brain Res.*, 941: 1-10

Koistinaho, J., Chan, P.H. (2000): Spreading depression-induced cyclooxygenase-2 expression in the cortex, *Neurochem. Res.*, 25:645-651

Lee, J. M., Grabb, M. C., Zipfel, G. J., Choi, D. W. (2000): Brain Tissue responses to ischemia. *L. Clin. Invest.*, 106: 723-731

Lin, H., Kin, T. N., Cheung, W. M., Nian, G. M., Tseng, P. H., Chen, S. F., Chen, J. J., Shyue, S. K., Liou, J. Y., Wu, C. W., Wu, K. K. (2002): Cyclooxygenase-1 and bicistronic cyclooxygenase-1/prostacyclin synthase gene transfer protect against ischemic cerebral infarction. *Circulation*, 105: 1962-1969

Lin, H., Sidiropoulos, P., Song, G., Pagliari, L.J., Birrer, M.J., Stein, B. Anrather, J., Pope, R.M. (2000): TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF- kappa B is independant of c-Jun or C/EBP beta. *J. Immunol.*, 164:4277-4285

Lipton, P. (1999): Ischemic cells death in brain neurons. *Physiol. Rev.*, 79: 1431-1568

Liu, T., Clark, R.K., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R. F., Barone, F.C., Feuerstein, G. Z. (1994): Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke*, 25:1481-1488

Lucas, S. M., Rothwell, N. J., Gibson, R. M. (2006): The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.*, 147: 232-240

Luo, Y., Yin, W., Signore, A. P., Zhang, F., Hong, Z., Wang, S., Graham, S. H., Chen, J. (2006): Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone. *J. Neurochem.*, 97: 435-448

Maeshiba, Y., Kiyota, Y., Yamashita, K., Yoshimura, Y., Motohashi, M., Tanayama, S. (1997): Disposition of the new antidiabetic agent pioglitazone in rats, dogs and monkeys. *Arzneimittelforschung*, 47: 29-35

Mattson, M. P., Culmsee, C., Yu, Z. F. (2000): Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell tissue Res.*, 301: 173-187

McAuley, M.A. (1995): Rodent models of focal ischemia. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 7: 153-180

Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S., Ceru, M. P., (2004): Immunolocalization of peroxysome proliferator-activated receptors and retinoid receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, 123: 131-145

Niwa, K., Haensel, C., Ross, M. E., Iadecola, C. (2001): Cyclooxygenase-1 participates in selected vasodilator responses of the cerebral circulation. *Circ. Res.*, 88: 600-608

Nogawa, S., Zhang, F., Ross, M. E., Iadecola, C. (1997): Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *L. Neurosci.*, 17: 2746-2755

Ou, Z., Zhao, S., Labiche, L.A., Strong, R., Grotta, J.C., Hermann, O., Aranowski, J. (2006): Neuronal expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and 15d-prostaglandin J₂-mediated protection of brain after experimental ischemia in rat. *Brain Res.*, 1096:196-203

Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K. (2005): A SUMOylation-dependant pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . *Nature*, 437:759-763

Patzer, A., Zhao, Y., Stöck, I., Gohlke, P., Heregen, T., Culmann, J. (2008): Peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) differently modulate the interleukin-6 expression in the peri-infarct cortical tissue in the acute and delayed phases of cerebral ischemia. *Eur. J. Neurosci.* 9: 1786-1794

Pereira, M.P., Hurtado, O., Cardenas, A., Alonso-Escolano, D., Bosca, L., Vivancos, J., Nombela, F., Leza, J.C., Lorenzo, P., Lizasoain, I., Moro, M.A. (2005): The nonthiazolidinedione PPAR gamma agonist L-796,449 is neuroprotective in experimental stroke. *Journal of Neuropathol Exp Nerol.*, 64:797-805

Ricote, M. und Glass, C.K. (2007): PPARs and molecular mechanism of transrepression. *Molecular and Cell Biology of Lipids*, 8: 926-935

Rothwell, N. J., Luheshi, G. N. (2000): Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic targets. *Trends Neurosci.*, 23: 618-625

Roux-Lombard, P. (1998): The interleukin-1 family. *Eur. Cytokine New*, 9: 565-576

Sasaki, T., Kitagawa, K., Yamagata, K., Takemiya, T., Tanaka, S., Omura-Matsuoka, E., Sugiura, S., Matsumoto, M., Hori, M. (2004): Amelioration of hippocampal neuronal damage after transient forebrain ischemia in cyclooxygenase-2-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.*, 24: 107-113

Schwab, J. M., Schluesener, H. J. (2003): Cyclooxygenases and central nervous system inflammation: conceptual neglect of cyclooxygenase-1. *Arch. Neurol.*, 60: 630-632

Sharp, F.R., Tang, Y., Millhorn, D.E. (2000): Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 20: 1011-1032

Shimazu, T., Inoue, I., Araki, N., Asano, Y., Sawada, M., Fuquay, D., Nagoya, H., Greenberg, J. H. (2005): A peroxysome proliferator-activated receptor-gamma agonist reduces infarct size in transient but not in permanent ischemia. *Stroke*, 36: 353-359

Staels, B., Fruchart, J. C. (2005): Therapeutic roles of the peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*, 54: 2460-2470

Sundararajan, S., Gamboa, J. L., Victor, N. A., Wanderi, E. W., Lust, W. D., Landreth, G. E. (2005): Peroxysome proliferator-activated receptor-gamma ligand reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia. *Neuroscience*, 130: 685-696

Sundararajan, S., Landreth, G. E. (2004): Antiinflammatory properties of PPARgamma agonists following ischemia. *Drug News Perspect.*, 17: 229-236

Swanson, R.A., Morton, M.T., Tsao-Wu, G., Savalos, R.A., Davidson, C., Sharp, F.R. (1989): A semi-automated method for measuring brain infarct volume. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 10: 290-293

Turini, M. E., DuBois, R. N. (2002): Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Anna. Rev. Med.*, 53: 35-57

Tureyen, K., Kapadia, R., Bowen, K.K., Satriotomo, I., Liang, J., Feinstein, D.L., Vemuganti, F. (2007): Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents. *J. Neurochem.*, 101: 41-56

Vasudevan, A. R., Balasubramanyam, A. (2004): Thiazolidinediones: a review of their mechanism of insulin sensitisation, therapeutic potential, clinical efficacy, and tolerability. *Diabetes Technol. Therap.*, 6: 850-863

Wang, Q., Tang, X.N., Yenari, M.A. (2007): The inflammatory response to stroke. *L. Neuroimmunol.*, 84: 53-68

Yi, J.H., Park, S.W., Kapadia, R., Vemuganti, R. (2007): Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. *Neurochem. Int.*, 50: 1014-1027

Yokota, C., Kaji, T., Kuge, Y., Inoue, H., Tamaki, N., Minematsu, K. (2004): Temporal and topographic profiles of cyclooxygenase-2-expression during 24 h of focal brain ischemia in rats. *Neurosci. Lett.*, 357: 219-222

Zhao, Y., Patzer, A., Gohlke, P., Herdegen, T., Culman, J. (2005): The intracerebral application of the PPARgamma-ligand pioglitazone confers neuroprotection against focal ischemia in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, 22: 278-282

Zhao, Y., Patzer, A., Herdegen, T., Gohlke, P., Culman, J. (2006): Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats. *FASEB J.* 20: 1162-1175

Zuhayra, M., Zhao, Y., von Forstner, C., Henze, E., Gohlke, P., Culman, J., Lützen, U. (2011): Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) reduces neuronal damage in the substantia nigra after transient focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 37:738-752

7 Veröffentlichungen

7.1 Publikationen

Zhao, Y., **Patzer, A.**, Gohlke, P., Herdegen, T., Culman, J. (2005): The intracerebral application of the PPAR γ -ligand pioglitazone confers neuroprotection against focal ischemia in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 22: 278-282

Zhao, Y., **Patzer, A.**, Herdegen, T., Gohlke, P., Culman, J. (2006): Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats. *FASEB J.* 20: 1162-1175

Patzer, A., Zhao, Y., Stöck, I., Gohlke, P., Herdegen, T., Culmann, J. (2008): Peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) differently modulate the interleukin-6 expression in the peri-infarct cortical tissue in the acute and delayed phases of cerebral ischemia. *Eur. J. Neurosci.* 9: 1786-1794

Liu, J. R., Zhao, Y., **Patzer, A.**, Staak, N., Boehm, R., Deuschl, G., Culman, J., Bonny, C., Herdegen, T., Eschenfelder, C. (2010): The c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor XG-102 enhances the neuroprotection of hyperbaric oxygen after cerebral ischaemia in adult rats. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 3:211-224

7.2 Nicht zitierbare wissenschaftliche Vorträge

Zhao, Y., **Patzer, A.**, Stöck, I., Gohlke, P., Herdegen, T., Culman, J. (2006): Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR γ) promotes neuroprotection after focal cerebral ischemia in the rat brain. Neuroprotection and Neurorepair, 4 th International Symposium, Focus 2006: Cerebral Ischemia and Stroke, Magdeburg, Deutschland.

Zhao, Y., **Patzer, A.**, Stöck, I., Peng, L., Herdegen, T., Culman, J. (2006): Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR γ) promotes neuroprotection after focal cerebral ischemia in the rat. Neuroscience 2006, Atlanta, Georgia, USA.

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi bedanken für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. J. Culman, der sich mit viel Leidenschaft und unermüdlichem Engagement um das Gelingen dieser Arbeit gekümmert hat.

Ich möchte mich ganz besonders bei Frau Dr. Zhao bedanken, die mich in die praktischen Arbeiten im Labor eingewiesen hat und mir jederzeit beratend zur Seite gestanden ist, für die unzähligen Stunden gemeinsamer Arbeit im Labor und ihre freundschaftliche Unterstützung

Den medizinisch-technischen Assistenten Frau B. Schwarten und Herrn J. Brdon möchte ich für die Einarbeitung und nicht zuletzt fortwährende Unterstützung bei den Tierexperimenten danken.

Mein abschließender Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Pharmakologischen Institutes für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Andreas Patzer
Wohnort: Kiel
Geburtsdatum: 05.09.1976
Geburtsort: Pforzheim
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

1983-87 Nordstadtgrundschule Pforzheim

1987-96 Kepler Gymnasium Pforzheim (Erwerb der allgemeinen Hochschulreife)

Zivildienst:

09/96-09/97 Heilpädagogisches Zentrum Pforzheim. Betreuung körperlich und geistig behinderter Kinder

Studium:

10/97- 03/99 Studium an der Pädagogischen Hochschule Heidelberg: Lehramt für Sonderpädagogik

04/99-03/02 Medizinstudium an der Ruprecht Karls Universität zu Heidelberg

04/02-09/02 Auslandssemester an der Universität Wien

10/02-05/08 Medizinstudium an der Christian Albrechts Universität zu Kiel (Staatsexamen im Mai 2008)

Beruflicher Werdegang:

Seit Juni 2008 Assistenzarzt in der Inneren Medizin am Friedrich Ebert Krankenhaus Neumünster