

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

**Systemische Behandlung mit Pioglitazon nach fokaler
zerebraler Ischämie:
Eine präklinische Studie an Ratten**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Lan Anh Miriam Nguyen Ngoc
aus Aachen

Kiel 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Juraj Culman, Institut für Experimentelle und
Klinische Pharmakologie

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Andreas Binder, Klinikum Saarbrücken
gGmbH, Chefarzt der Klinik für Neurologie

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juni 2018

Zum Druck genehmigt:: 31. März 2018

gez. Prof. Dr. Markus Bleich

Inhaltsverzeichnis

Danksagung

Abkürzungen

1. Einleitung

1.1	Der ischämische Schlaganfall	01
1.1.1	Epidemiologie & Ätiologie	01
1.1.2	Pathomechanismen	02
1.1.3	Entzündungsreaktion	04
1.1.4	Apoptose	05
1.2	Therapiemöglichkeiten	06
1.2.1	Aktuelle Therapiemöglichkeiten	06
1.2.2	Neue Therapiemöglichkeiten zur Neuroprotektion	07
1.3	Der Peroxisom Proliferator-aktivierte Rezeptor-γ	09
1.3.1	PPAR- γ -Agonisten und der ischämische Schlaganfall	10
1.4	Fragestellung	12

2. Material & Methoden

2.1	Versuchstiere	14
2.2	Operationstechniken	14
2.2.1	Implantation von Sonden zur Messung der Hirndurchblutung	14
2.2.2	Verschluss der Arteria cerebri media	15
2.2.3	Implantation des Femoralkatheters	16
2.3	Messung der kardiovaskulären Parameter	16
2.3.1	Messung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) und der Herzfrequenz (HF)	16
2.3.2	Messung der physiologischen Parameter im Blut	17

2.4	Neurologische Untersuchung	17
2.4.1	Beurteilung des neurologischen Status nach Bederson	17
2.4.2	Erfassung des neurologischen Status nach Garcia	18
2.5	Entnahme der Gehirne	20
2.6	Infarktvolumen und Ödembildung	21
2.6.1	Bestimmung des Infarktvolumens mittels Kresylviolett-Färbung	21
2.6.2	Bestimmung des Infarktvolumens mittels Fluoro-Jade C-Färbung	22
2.7	Immunhistochemie	22
2.7.1	Durchführung der immunhistochemischen Färbung	23
2.8	Versuchsprotokolle	25
2.9	Statistische Analyse	28
3.	Ergebnisse	
3.1	Effekte einer einmaligen und wiederholten systemischen Behandlung mit Pioglitazon auf den Glukosespiegel im Blut	30
3.2	Protokoll 1: Effekte der systemischen Behandlung mit Pioglitazon auf das Outcome in der frühen Phase (2 Tage) nach ischämischem Schlaganfall	31
3.2.1	Regionaler zerebraler Blutfluss (rCBF) während MCAO und in der Reperfusionphase	31
3.2.2	Infarktvolumen und Ödem	32
3.2.3	Neurologischer Status	33
3.2.4	Immunhistochemische Untersuchung	36
3.2.5	Mortalität	37
3.2.6	Kardiovaskuläre und physiologische Parameter	38

3.3	Protokoll 2: Effekte der systemischen Behandlung mit Pioglitazon in der späten Phase (5 Tage) nach ischämischem Schlaganfall	42
3.3.1	Regionale zerebrale Durchblutung während MCAO und in der Reperfusionphase	42
3.3.2	Infarktvolumen und Ödem	42
3.3.3	Neurologischer Status	43
3.3.4	Mortalität	46
3.3.5	Immunhistochemische Untersuchung	46
4.	Diskussion	49
5.	Zusammenfassung	56
	Literaturverzeichnis	58
	Lebenslauf und Veröffentlichungen	67
	Veröffentlichung zu dieser Doktorarbeit	69
	Ausnahmegenehmigung für Tierversuche	80

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi bedanken, für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel anfertigen zu dürfen.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Dr. Juraj Culman möchte ich von ganzem Herzen für seine Geduld und die Mühe im Rahmen dieser Arbeit, für die etlichen Korrekturen und für die verständnisvollen Ermunterungen in jeder Lebenslage bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Yi Zhao für die tolle Einweisung und Unterstützung im Labor und die vielen Stunden gemeinsamen Arbeitens im Institut.

Außerdem möchte ich mich beim medizinisch-technischen Personal bedanken, vor allem bei Britta Schwarten und Jan Brdon, für ihre wertvolle Mitarbeit im Tierstall und im Labor.

Schließlich möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, die mir nebst etlichen Ablenkungen auch ihre stetige Unterstützung und Liebe gaben.

Abkürzungen

15-d-PGJ ₂	15-desoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J ₂
ACCESS	Acute Candesartan Cilexetil Evaluation in Stroke Survivors
AMPA-	α -Amino-3-hydroxy-5methyl-4-isoxazol-Propionsäure
art.	arteriell
ATP	Adenosintriphosphat
rCBF	regionaler zerebraler Blutfluss
Ca ²⁺	Calcium
Cl ⁻	Chlorid
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
CuZn	Kupfer-Zink
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GLP	Good Laboratory Practice
H ⁺	Wasserstoff
ICAM-1	interzelluläre Adhäsionsmolekül-1
ICV	intra-zerebroventrikulär
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP ₃	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kalium
KG	Körpergewicht
MCAO	Okklusion der mittleren Zerebralarterie
MRT	Magnetresonanztomographie
Na ⁺	Natrium
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NSARs	nichtsteroidale Antirheumatika
ONOO ⁻	Peroxinitrit
PARP p 85	Poly (ADP-ribose) polymerase p 85
Pio	Pioglitazon
PPAR	Peroxisom Proliferator-aktivierender

PPRE	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor <i>response element</i>
RIGOR	Workshop on Clinical Research through Rigorous Study Design and Transparent Reporting
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rtPA	rekombinanter Gewebsplasminogen Aktivator
RXR	Retinoid X-Rezeptor
s.c.	subkutan
SCAST	Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial
SD	Standard Deviation
s.p.m.	Schläge pro Minute
STAIR	Stroke Therapy Academic Industry Roundtable
TLR4	toll-like Rezeptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TZDs	Thiazolidindione
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Der ischämische Schlaganfall

1.1.1 Epidemiologie & Ätiologie

In der Reihenfolge der häufigsten Todesursachen nimmt der Schlaganfall in den industrialisierten Ländern die dritte Stelle ein und ist der häufigste Grund für die dauerhafte Invalidität im Erwachsenenalter mit über 15 Millionen aktuell vom Schlaganfall betroffenen Menschen weltweit (Green und Shuaib 2006). Durchschnittlich belaufen sich die lebenslangen Behandlungskosten pro Schlaganfallpatient in Deutschland auf 43,129 Euro, wobei in dieser Hochrechnung die so genannten indirekten Kosten nicht berücksichtigt sind, welche, zum Beispiel, durch eine frühzeitige Erwerbsunfähigkeit oder die unentgeltliche Pflege durch Angehörige und Bekannte entstehen (Kolominsky-Rabas et al. 2006). Seit Anfang der 1990er ist zwar die Letalität deutlich zurückgegangen, allerdings sterben immer noch rund 30 % aller Schlaganfallpatienten innerhalb eines Jahres nach dem Ereignis mit einem nachfolgenden Letalitätsrisiko von 9% pro Jahr (Diederichs et al. 2011, Heiss 1997). In Deutschland beträgt die Inzidenz für ischämische Schlaganfälle 160 – 240/100000 Einwohner, wobei sie mit steigendem Lebensalter stetig zunimmt – ungefähr die Hälfte aller Schlaganfallpatienten ist über 70 Jahre alt.

Während es in 15% der Fälle zu einem hämorrhagischen Infarkt aufgrund einer Hirnblutung kommt, entstehen ungefähr 85% aller Schlaganfälle aufgrund einer akuten fokalen Durchblutungsstörung durch den Verschluss einer der Hauptarterien des Gehirns.

Risikofaktoren für einen ischämischen Schlaganfall sind die typischen Erkrankungen des metabolischen Syndroms: Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus und kardiale Erkrankungen. Zudem tragen auch Gerinnungsstörungen, Rauchen, männliches Geschlecht, hohes Alter und eine genetische Prädisposition zum erhöhten Risiko bei.

Worin liegt nun die schlechte Prognose nach einem Schlaganfall? Die Gründe finden sich vor allem im Mangel an effektiven Therapiemöglichkeiten nach zerebraler Ischämie.

1.1.2 Pathomechanismen

Durch den Verschluss einer der versorgenden Hauptarterien des Gehirns, meistens aufgrund eines Embolus oder einer lokalen Thrombose, kommt es im betroffenen Gebiet zu einer vorübergehenden oder permanenten Minderung des zerebralen Blutflusses. Die normale durchschnittliche Durchblutung des Gehirns beträgt 80 ml pro 100 g Hirngewebe pro Minute. Das Gehirn des Erwachsenen gewinnt annähernd seine gesamte Energie durch die oxidative Phosphorylierung von Glukose. Entsprechend sind die Energiereserven begrenzt, sodass eine fokale Störung des Blutflusses die Lieferung der notwendigen Substrate stark beeinträchtigen kann und, in der Folge energieabhängige Stoffwechselfvorgänge, wie der Erhalt des ionischen Gradienten in Gehirnzellen, stört (Dirnagl et al 1999). Unterschreitet die Durchblutung des Gehirns einen Wert von etwa 20 ml/100 g/min kommt es zu Störungen der neuronalen Funktion. Bei weiterem Absinken der Durchblutung kommt es zu einem Zusammenbruch der Membranintegrität und zu irreversiblen Schäden. Experimentellen Daten zufolge gehen durchschnittlich 2 Millionen Nervenzellen pro Minute während eines arteriellen Verschlusses im Gehirn unter (Auriel und Bornstein 2010).

Im Bereich der arteriellen Okklusion entstehen zwei unterschiedliche Zonen: Der Ischämiekern, in dem die Neuronen durch die akute Unterversorgung bereits zu Grunde gegangen sind, und die sogenannte Penumbra, dessen Zellen zwar ebenfalls geschädigt sind, jedoch noch vital sind und noch nicht vollständig von einer Funktionsstörung zu einer irreversiblen Schädigung übergegangen sind. Diese Zellen werden zwar noch durch Kollateralen mitversorgt, sind jedoch aufgrund von neurodegenerativen Prozessen gefährdet, sodass sich hier der erfolgversprechendste Therapieansatzpunkt bietet (Heiss 1997).

Durch die Destabilisierung des regulären Membranpotentials kommt es zur Depolarisation der Neuronen und Gliazellen. Es folgt eine Aktivierung der somato-dendritischen und präsynaptischen spannungsabhängigen Kalziumkanäle und eine Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern, wie zum Beispiel Glutamat, in den Extrazellulärraum. Gleichzeitig ist dessen Wiederaufnahme durch den Energiemangel gestört, und folglich kommt es zur Akkumulation von Glutamat im Extrazellulärraum. Andere Neurotransmitter, wie z.B. Dopamin, werden ebenfalls in den Extrazellulärraum freigesetzt. Dies könnte ursächlich für das Absterben von striatalen Neuronen sein (Lee et al. 2000). Die Kalziumüberlastung, ein weiterer Schritt in den pathogenetischen Abläufen, wird weiter durch die Aktivierung von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)- und metabotropischen Glutamat-

Rezeptoren, sowie die Aktivierung der Inositoltriphosphat (IP₃)-Signalkaskade angetrieben. Kalzium, Natrium und Chlorid strömen über Ionenkanäle (z.B. den AMPA- [α -Amino-3-hydroxy-5methyl-4-isoxazol-Propionsäure-] Rezeptorkanal) in die Zelle, passiv gefolgt von Wasser mit nachfolgender Ödembildung des Gewebes. Des Weiteren kommt es zur hypoxisch bedingten anaeroben Glykolyse mit stark erhöhter Laktatbildung. Die überschüssigen H⁺-Ionen werden durch Na⁺-Ionen ausgetauscht, denen wiederum Wasser passiv folgt und die Ödembildung noch verstärkt (Heiss et al. 1997). Die daraus entstehenden Folgen—erhöhter intrakranieller Druck, vaskuläre Kompression und eine mögliche Herniation—haben einen weiteren negativen Einfluss auf die bereits defizitäre Perfusion des betroffenen Areals. Die Ödembildung und -ausbreitung ist ein früher Marker für die weiterführende Pathophysiologie und ist auch ein großer Einflussfaktor für das Überleben des Patienten über die ersten kritischen Stunden hinaus (Dirnagl et al. 1999).

Der Kalziumanstieg im Infarktareal führt zu Gewebeschäden, mutmaßlich durch die Aktivierung proteolytischer Enzyme, die einen Abbau von Proteinen des Zytoskeletts und der Extrazellulärmatrix zur Folge haben. Der massive Ca²⁺-Einstrom induziert ebenso über eine Aktivierung von Enzymsystemen, wie der Phospholipase A₂, Phospholipase C und der Cyclooxygenase (COX), die Bildung von freien Radikalen. Diese schädigen die Zellmembran, wenn die Kapazität endogener Radikalfänger überschritten wird. Die wichtige Rolle dieser Mechanismen in der Pathogenese der Zellschädigung wird unter anderem dadurch bewiesen, dass sogar bei verzögerter Behandlung mit Radikalfängern das Ausmaß des Gewebeuntergangs reduziert wird und eine Überproduktion von Radikalfängern günstige Auswirkungen hat (Mattson et al. 2000). Darüber hinaus fungieren freie Radikale auch als Trigger für Entzündung und Apoptose. Es kommt zu einem Integritätsverlust der Basalmembran der Mitochondrien, hauptsächlich durch Porenbildung mit nachfolgender Schwellung und Schädigung der Zellorganelle. Folglich kann sie ihrer Funktion als ATP-Produzent nicht mehr nachkommen. Cytochrom C wird aus den Mitochondrien freigesetzt und Caspase-3 wird aktiviert, was den programmierten Zelltod zur Folge hat. Die wiederholte Repolarisation mit erneuter Depolarisation (sogenannte Exzitotoxizität) führt zu einem weiter steigenden Energieverbrauch, sodass es zu einem zunehmenden Energiemangel kommt (Lee et al. 2000, Dirnagl et al. 1999).

1.1.3 Entzündungsreaktion

Die Entzündungsreaktionen im Gehirn weisen durchaus Unterschiede zu denen in anderen Organen auf. Dies spielt eine wichtige Rolle im Infarktgeschehen und dessen Progression, sowohl in der frühen als auch der späten Phase nach einem Insult (Wang et al. 2007, Lucas et al. 2006). Es kommt im ischämischen Gewebe durch die Induktion von Adhäsionsmolekülen, wie das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) sowie P- und E-Selektinen, am Endothelium zu einer gesteigerten Adhäsionsfähigkeit von neutrophilen Granulozyten und erleichtert deren Eindringen durch die Gefäßwand in das betroffene Hirngewebe. Dies führt wiederum dazu, dass Makrophagen und Monozyten in das Gewebe einwandern und die Zytokin-Induktion steigern. Zu nennen sind vor allem die Entzündungsmediatoren Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6), die bereits eine Stunde nach Ischämie erhöhte Werte im Gewebe aufweisen. Hierdurch werden weitere Entzündungszellen angelockt (Lee et al. 2000, Huang et al. 2006). Die Verbesserung des neurologischen Status nach Reduktion der zirkulierenden Neutrophilen, sowie der Antikörpermedierten Blockade von Adhäsionsmolekülen bzw. dessen Fehlen in genetisch veränderten Mäusen, liefert ausreichende Anhaltspunkte für den negativen Einfluss der entstehenden Entzündungsreaktion nach ischämischem Infarkt (Dirnagl et al. 1999).

Auch nach dem Eintritt der Reperfusion, sei es nun spontan oder durch eine Thrombolyse, laufen die ausgelösten biochemischen und molekularen Störungen weiter, sodass es in der Sekundärphase trotz nun ausreichender bzw. gesteigerter Durchblutung zu weiteren Gewebeschäden kommt. Durch die Sauerstoffzufuhr wird die Bildung von Superoxid-, Hydroxyl- und Stickstoffmonoxid- (NO-) radikalen angekurbelt. NO wird zusätzlich durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS, im Gehirn die spezifische neuronale NOS, nNOS) gebildet. Diese wird in Makrophagen, Neutrophilen und Mikroglia exprimiert, die sich durch die Entzündungsreaktion anhäufen, und trägt ebenfalls zur Gewebeschädigungen durch verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel der Inhibition von ATP-produzierenden Enzymen, DNA-Schädigung und oxidativer Zerstörung durch die Bildung von Peroxinitrit (ONOO $^-$) bei (Lee et al. 2000, Heiss 1997, Iadecola & Alexander 2001).

Die Cyclooxygenase (COX) ist ein Enzym, welches Prostaglandine und Thromboxane produziert. Die COX-2 wird nur in einigen Zellen des ZNS exprimiert. Während einer Entzündungsreaktion wird die COX-2 Expression erhöht und trägt durch die Produktion von freien Sauerstoffradikalen (Superoxid, welches sich mit NO zu toxischem ONOO $^-$ verbindet) und Prostaglandinen zur Gewebeschädigung bei.

Präklinische Studien haben gezeigt, dass vor allem eine Blockade der iNOS und der COX-2, und folglich eine verminderte Entzündungsreaktion den ischämischen Schaden, selbst nach Eintritt der Reperfusion, positiv beeinflussen kann (Iadecola & Alexander 2001).

Das Tubulin besteht aus einer α - und einer β -Einheit, wobei das β -Tubulin wiederum in sieben verschiedene Isotypen eingeteilt wird. Prinzipiell können alle Isotypen die grundlegenden Funktionen des Tubulins erfüllen, wie zum Beispiel die Spindelbildung während der Mitose. Jedoch kommen in Neuronen hauptsächlich die Isotypen β I, β II und β III vor. Während das β I-Tubulin für das Überleben der Zellen während der Differenzierung wichtig ist, ist das β II-Tubulin hauptsächlich für das Wachstum von Neuriten zuständig. Das β III-Tubulin wiederum spielt eine wichtige Rolle für den Schutz der Neuronen gegen freie Radikale, die beim Schlaganfall deutlich vermehrt gebildet werden. Dementsprechend schützt eine vermehrte Expression des β III-Tubulin die Zellen des ischämischen Kerns sowie der Penumbra vor weiterem oxidativem Stress (Zuhayra et al. 2011).

Mikroglia sind die Makrophagen des ZNS. Bei Infektion, Entzündung, Trauma und Ischämie kommt es zur Aktivierung und Umwandlung der Mikroglia zu Phagozyten. Der Aktivierungsmechanismus ist nicht ausreichend geklärt. Es ist anzunehmen, dass dies über die Stimulation des toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und der CD14-Expression geschieht, die in den Monozyten und Mikroglia von Infarktpatienten nachgewiesen worden sind. Experimentelle Daten leiten zur Annahme, dass ihre Präsenz zur weiteren neuronalen Schädigung nach Ischämie führt: die Suppression der mikroglialen Aktivierung resultierte in einem reduzierten Infarktvolumen und einem besseren neurologischen Status bei Mäusen und Ratten nach Ischämie (Wang et al. 2007, Dirnagl et al. 1999).

1.1.4 Apoptose

Im Hirngewebe kommt es beim Schlaganfall durch die ausbleibende Blutversorgung, den Verlust an Substraten zur Energieerzeugung und den inflammatorischen Abläufen, die mit dem Infarkt einhergehen, zum Zelltod. Es sind zwei Formen des Zelltodes zu unterscheiden: Nekrose und Apoptose. Während es sich bei der Nekrose um das akute Absterben stark geschädigter Neuronen durch den plötzlichen Sauerstoff- und Energiemangel handelt, wobei auch das Nachbargewebe in Mitleidenschaft gezogen werden kann, ist die Apoptose eine Art des „programmierten Zelltodes“ der meist weniger geschädigten Zellen. Im Unterschied zur Nekrose, die unmittelbar und früh eintritt, wurde im Tiermodell gezeigt, dass

die Apoptose teilweise erst am dritten Tag nach Ischämie im Randgebiet des Infarkts, der sogenannten Penumbra, auftrat. Zellen, die durch Apoptose zugrunde gehen, tun dies unter ATP-Verbrauch aktiv und ohne entzündliche Begleitreaktion und, im Gegensatz zur Nekrose, ohne Schädigung des Nachbargewebes. Dazu ist eine funktionierende Proteinsynthese notwendig, denn hierbei spielen spezifische Proteasen (*Cystein-abhängige Aspartat-Proteasen* oder Caspasen) eine wichtige Rolle und dienen als Mediatoren des Zelluntergangs. Die sogenannten Effektor-Caspasen führen zur DNA-Fragmentierung und Spaltung von wichtigen Substratproteinen (Padosch et al. 2001). Im Tiermodell konnte beispielsweise bereits 24-Stunden nach Ischämie eine deutlich angestiegene Konzentration von Caspase 3 in Neuronen und Mikroglia des ischämischen Areals nachgewiesen werden. Die Mitochondrien spielen ebenfalls eine Hauptrolle bei der Apoptose im Infarktareal, da durch sie, im Falle eines Energiemangels, freie Sauerstoffradikale induziert werden, die die Doppelbindungen der Fettsäuren in der Zellmembran attackieren und somit die autolytische Kaskade in Gang setzen. Dies wird experimentell dadurch belegt, dass die Verabreichung von Antioxidantien einen verminderten Effekt von neuronalen Schäden zur Folge hat (Mattson et al. 2000). Übergänge von der Apoptose zur Nekrose sind ebenso bekannt. Zellen, in denen primär eine Apoptose initiiert wurde, können bei zunehmendem Energiemangel sekundär in eine nekrotische Degeneration übergehen (Dirnagl et al. 1999).

1.2 Therapiemöglichkeiten

1.2.1 Aktuelle Therapiemöglichkeiten

Bis dato ist die rekanalisierende Therapie mit rekombinantem Gewebsplasminogen Aktivator (rtPA), auch Alteplase genannt, die einzige zugelassene Therapie für die Akutbehandlung des ischämischen Schlaganfalls, nach Ausschluss eines hämorrhagischen Infarkts (Adams et al., 2007, Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2012). Begleitende therapeutische Maßnahmen sind symptomorientiert, wie etwa eine ausreichende Oxygenierung, die Kontrolle und Behandlung von hypertensivem Blutdruck, die Einhaltung von normalen Blutzuckerwerten und die Überwachung und Stabilisierung weiterer physiologischer Parameter, wie der Körpertemperatur und der Elektrolythomöostase.

In der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie wird für die Behandlung mit rtPA ein Zeitfenster von 4,5 Stunden nach Symptombeginn empfohlen. Aufgrund des

engen therapeutischen Zeitfensters, dem Risiko für eine intrazerebrale Blutung sowie weiteren Kontraindikationen werden jedoch nur 1 - 8,5% aller Schlaganfallpatienten mit rtPA behandelt, obwohl 22-50% der Patienten innerhalb dieses Zeitfensters hospitalisiert werden. Auch ist die Lysebehandlung bei sehr schweren Infarkten aufgrund des Sekundärblutungsrisikos kontraindiziert. Von den Patienten, die tatsächlich einer Therapie mit rtPA unterzogen werden, erreichen weniger als 40% eine systemische Reperfusion (Millán et al. 2006). Studien mit rtPA haben gezeigt, dass nur 7,2% der Patienten von der Therapie profitieren, sofern die Verhinderung von Behinderung und Tod der Nichtbehandlung gegenübergestellt wird. Es handelt sich um ein Kollektiv mit erhöhtem Risiko einer symptomatischen zerebralen Blutung. Eine weitere, jedoch auch durch Limitationen geplagte, Behandlungsmöglichkeit besteht in dem Versuch einer Thrombusextraktion. Trotzdem besteht eine dringende Notwendigkeit für neue und gut verträgliche Therapieansätze, die für die Mehrzahl von Schlaganfallpatienten verfügbar gemacht werden könnten und zu einer Verbesserung der Prognose, neurologisch und kognitiv, führen würden.

1.2.2 Neue Therapiemöglichkeiten zur Neuroprotektion

Für Kliniker und Wissenschaftler zugleich ist der Therapieansatz der Neuroprotektion schon lange ein Thema zuversichtlicher Hoffnung und intensiver Forschung. Der Beginn von klinischen Studien zur Evaluierung von neuroprotektiven Wirkstoffen bei Schlaganfall liegt in den 1980er Jahren (Auriel und Bornstein 2010, Ginsberg 2008). Neuroprotektiva greifen nach einer zerebralen Ischämie an verschiedenen Stellen in die Schadenskaskade ein und sollen die apoptotischen Prozesse in der Penumbra verhindern. Dies würde zu einer Reduktion der Infarktgröße führen und eine Verbesserung des neurologischen Status nach sich ziehen. Viele Substanzen und Substanzklassen, die im Tiermodell eine robuste neuroprotektive Wirkung aufwiesen, sind in klinischen Studien am Menschen gescheitert. Leider hat bislang kein Neuroprotektivum seine Wirksamkeit in mehr als einer unabhängigen prospektiven randomisierten doppelblinden Placebo-kontrollierten Phase III-Studie belegen können.

Diverse Pharmaka sind bereits getestet worden. Selfotel, Eliprodel oder Aptiganel sind Substanzen, die mit dem NMDA- Rezeptor interagieren und ihn auf unterschiedliche Weise zu blockieren vermögen. Hier besteht das Problem des sehr engen Behandlungszeitfensters, welches nur ein bis zwei Stunden nach Gefäßokklusion beträgt. Das Nebenwirkungsprofil dieser Substanzen, dass durch den unspezifischen Effekt der exzitatorischen Blockade

entsteht, wie zum Beispiel Psychotomimese, Atemdepression und kardiovaskuläre Dysregulation, verhindert, dass sie zu ihrer neuroprotektiven Wirkung ausreichend hoch dosiert werden können (Dirnagl et al. 1999). Viele andere Pharmaka, wie zum Beispiel die Calcium-Antagonisten und die Natrium-Kanal-Blocker, die hervorragende neuroprotektive Effekte im Tierversuch baten, waren in klinischen Studien ineffektiv. In einer großen Metaanalyse ergaben sich Hinweise, dass der Calcium-Antagonist Nimodipin nach oraler Gabe das funktionelle Ergebnis nach Infarkt verbessert (Horn et al. 2001). Eine durchgeführte prospektive Studie wurde allerdings wegen einer fehlenden Wirkung des Medikaments abgebrochen. Auch der Natrium-Kanalblocker Fosphenytoin hat in der Phase III der klinischen Prüfung keine Wirksamkeit zeigen können. Mehr als 50 weitere Substanzen wurden in zahlreichen kontrollierten Studien bei Patienten nach einem akuten ischämischen Schlaganfall geprüft, ohne einen deutlich nachweisbaren Vorteil für diese Patienten zu zeigen (Horn und Limburg 2001). Ein typisches Beispiel ist das Schicksal von NXY-059—einem freien Radikalfänger/Antioxidant. Die erste klinische Phase III Studie SAINT I (Stroke-Acute-Ischemic NXY Treatment) konnte neuroprotektive Effekte nachweisen (Lees et al. 2006). Daraufhin folgte die SAINT II-Studie, die diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigte (Shuaib et al. 2007). Die genaue Analyse dieses Misserfolgs ergab, dass die präklinischen Tierversuche nicht nach den strengsten Kriterien durchgeführt und teilweise missinterpretiert wurden, und die klinischen Studien inadäquat entworfen wurden. Darüber hinaus wurde im Nachhinein festgestellt, dass die statistische Analyse der Ergebnisse keine ausreichende Aussagekraft hatte (Koziol und Feng 2006, Savitz und Fisher 2007, Macleod et al. 2008). Ähnlich enttäuschend verlief die zweite klinische Studie mit dem AT₁-Blocker Candesartan bei Schlaganfallpatienten. In allen präklinischen Studien, auch in denen aus unserem Labor, konnten neuroprotektive Eigenschaften von Candesartan bei experimentell induzierten zerebralen Ischämien nachgewiesen werden (Groth et al. 2003, Brdon et al. 2007). Die ACCESS (Acute Candesartan Cilxetil Evaluation in Stroke Survivors) Studie, die an einem kleinen Kollektiv von Patienten nach ischämischen Schlaganfall durchgeführt wurde, zeigte, dass eine frühe Blockade der AT₁-Rezeptoren nach einer Ischämie signifikant die Morbidität und Mortalität senkt (Schrader et al. 2003). Die nachfolgende randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Phase III-Studie SCAST (Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial) konnte dagegen keine günstigen Effekte einer schnellen Blutdrucksenkung mit Candesartan bei Patienten, die einen akuten Schlaganfall erlitten hatten, nachweisen. Tatsächlich zeigte sich hier sogar eine Verschlechterung des neurologischen Outcome und eine erhöhte Todesrate der behandelten Probanden (Sandset et al. 2011).

Eine der wichtigsten Ursachen für das Scheitern aller klinischen Studien scheint in der Tatsache begründet zu sein, dass die tierexperimentellen Studien, die für die klinischen Studien unentbehrlich sind, nicht nach den erforderlichen strengen Kriterien durchgeführt worden sind (zum Beispiel wurde eine zu kleine Anzahl an Tieren pro Versuchsgruppe verwendet) und die Ergebnisse dieser Studien nicht adäquat statistisch ausgewertet und sogar teilweise missinterpretiert wurden. Diese Mängel sind seit langem bekannt und wurden bereits genauestens analysiert (Macleod et al. 2009). Auch hat es bereits 2006 klar definierte Verbesserungsvorschläge gegeben, hauptsächlich bezüglich der Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe, der statistischen Analyse, der Reproduzierbarkeit und der Veröffentlichung negativer Ergebnisse (Dirnagl et al. 2006). Im Jahre 2009 wurden durch zwei Komitees, dem Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) und dem Good Laboratory Practice (GLP), die Leitlinien für präklinische Studien an Schlaganfallmodellen bei Nagern veröffentlicht (Liu et al. 2009a). Allerdings blieb die erhoffte Qualitätsbesserung der wissenschaftlichen Studien über die Neuroprotektion bei Nagern aus. Folglich haben viele pharmazeutische Firmen das Interesse an der präklinischen Schlaganfallforschung verloren und ihre finanzielle Unterstützung für die Entwicklung von Neuroprotektiva zurückgezogen (Dirnagl und Fisher 2012). Schließlich wurde nach einer Analyse der Situation beim Workshop on Clinical Research through Rigorous Study Design and Transparent Reporting (RIGOR) beschlossen, dass nur die Studien, die die STAIR- und RIGOR-Kriterien einhalten, eine finanzielle Unterstützung erhalten sollen. Hierdurch wird erhofft, dass mehr reproduzierbare Ergebnisse in der Schlaganfallforschung auf internationaler Ebene entstehen (Lapchak et al. 2013). Die nachfolgend vorgestellte Studie richtet sich nach den oben genannten Kriterien.

1.3 Der Peroxisom Proliferator-aktivierte Rezeptor- γ

Die Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptoren sind Zellkernrezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Genexpression für den Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt sind. Sie werden durch ihre Liganden aktiviert und bilden dann zusammen mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR) Heterodimere, die am Promoter des Zielgens an das *PPAR response element* (PPRE) binden, um die Transkription des Gens zu aktivieren. Ohne Liganden sind sie mit Repressor-Komplexen assoziiert und inhibieren die Transkription. Sie werden in 3 Subtypen eingeteilt: PPAR- α , - β (auch PPAR- δ genannt) und - γ . PPAR- α kommen in Leber, Nieren, Darm, Herz- und Skelettmuskelzellen vor und

regulieren den Energiehaushalt durch die Verstoffwechslung von Fettsäuren und Cholesterin, sowie die Modulierung der Glukoneogenese und des Triglyzeridstoffwechsels. PPAR- β kommen ubiquitär vor, sind aber besonders hoch nachweisbar im Darmtrakt, im Plazentagewebe und in der quergestreiften Muskulatur. PPAR- γ existieren in den Isoformen PPAR- γ 1 und PPAR- γ 2. Während das PPAR- γ 1 hauptsächlich im braunen und weißen Fettgewebe und in kleinerem Umfang auch im Herz- und Skelettmuskel vorkommt, tritt PPAR- γ 2 in unterschiedlichen Gewebetypen auf, vor allem im ZNS sowie im Darmtrakt und in einigen Entzündungszellen. Der Rezeptor bewirkt hauptsächlich die Differenzierung von Adipozyten und die Lipideinlagerung im Gewebe und ist auch an einer Reduktion von Glukose im Serum beteiligt (Heneka und Landreth 2007). Die natürlich vorkommenden Liganden der PPAR sind Eicosanoide (wie z.B. das 15-desoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂)) und Fettsäuren (wie die Arachidonsäure). Zur Stimulation der Rezeptoren können therapeutisch auch synthetische Liganden eingesetzt werden. Hierzu gehören die Thiazolidindione (TZDs), wie zum Beispiel Pioglitazon und Rosiglitazon (allgemein Glitazone genannt) und, jedoch mit einer niedrigeren Affinität für den Rezeptor, auch nichtsteroidale Antirheumatika (NSARs) wie Ibuprofen und Indomethacin (Desvergne und Wahli 1999).

1.3.1 PPAR- γ -Agonisten und der ischämische Schlaganfall

Im zentralen Nervensystem kommt der PPAR- γ -Rezeptor in Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und den Endothelzellen der Blutgefäße vor. Unter physiologischen Bedingungen ist der Rezeptor, wie bereits beschrieben, wahrscheinlich an der Regulation des Fettstoffwechsels beteiligt (Bordet et al. 2006). Eine bedeutende Rolle scheint der PPAR- γ jedoch unter pathologischen Zuständen des Gehirns zu spielen, wie zum Beispiel bei neurodegenerativen oder post-ischämischen Prozessen. Zahlreiche Studien haben bereits über die neuroprotektive Wirkung der PPAR- γ -Agonisten bei der zerebralen Ischämie im Tiermodell berichtet. Im ischämischen Gewebe konnte eine erhöhte Konzentration des PPAR- γ bis zu 14 Tage nach dem Insult nachgewiesen werden (Culman et al. 2007). Außerdem bewirkt die Aktivierung des Rezeptors eine weitere Steigerung der Rezeptorexpression und potenziert die Bindung des aktivierten Rezeptors an das PPRE in der DNA. Dieser Effekt ist PPAR- γ -abhängig, denn eine irreversible Inhibition des Rezeptors verhindert auch dessen gesteigerte Expression (Ou et al. 2006, Luo et al. 2006, Zhao et al. 2006a, Glatz et al. 2010).

Die TZDs sind spezifische Agonisten des PPAR- γ und werden als Insulin-sensitizer in der Therapie des Typ-2 Diabetes eingesetzt. Sie erhöhen die Insulinsensitivität und verringern die Insulinresistenz im Fettgewebe, Skelettmuskel und in der Leber. Im Gefäßsystem haben TZDs anti-atherothrombotische Effekte und antagonisieren das metabolische Syndrom durch die Herabregulierung von peripheren Entzündungsprozessen. Auch im ZNS hat sich letzterer Effekt gezeigt. Bei den meisten Untersuchungen wurden PPAR- γ -Agonisten, hauptsächlich Pioglitazon und Rosiglitazon, systemisch vor oder während des ischämischen Insults appliziert. Im Allgemeinen bewirkte die Aktivierung des Rezeptors eine Reduktion des Schlaganfallvolumens und der neurologischen Defizite der behandelten Tiere. Es wurden zahlreiche Mechanismen, die für die neuroprotektive Wirkung des PPAR- γ sprechen, untersucht. Durch die Behandlung mit TZDs kam es zu einer verminderten Induktion und Aktivierung von NF- κ B, sowie einer herabregulierten Expression von pro-inflammatorischen Faktoren, Zytokinen und Chemokinen, wie IL-1 β , IL-6, iNOS und COX-2. Zu den anti-inflammatorischen Effekten einer PPAR- γ -Aktivierung zählte auch die reduzierte Induktion des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und der Matrix-Metalloproteinase-9. Dadurch kam es zu einer Verminderung der Akkumulation von Makrophagen und der Aktivierung von mikroglialen Zellen (Sundararajan et al. 2005, Pereira et al. 2005, Luo et al. 2006, Tureyen et al. 2007). Die Stimulation des Rezeptors reduzierte den oxidativen Stress im ischämischen Gewebe. Erhöhte Spiegel antioxidierender Enzyme, wie der CuZn-Superoxiddismutase, bewirkten eine geringere Belastung des geschädigten Gewebes mit freien Sauerstoffradikalen (Shimazu et al. 2005, Tureyen et al. 2007). Hauptsächlich scheinen die neuroprotektiven Effekte der TZDs durch die Auswirkungen am Gefäßendothel vermittelt zu sein. Jedoch kann eine Beeinflussung der zerebralen Mechanismen nicht ganz ausgeschlossen werden, da eine zentrale, intrazerebroventrikuläre (ICV) Applikation eines PPAR- γ -Agonisten ähnliche positive Effekte zeigte wie eine systemische Behandlung. Die meisten Ergebnisse, die diese Effekte nachweisen, wurden in unserem Labor generiert. Eine ICV-Infusion von Pioglitazon vor, während und nach einer Okklusion der mittleren Zerebralarterie (MCAO) reduzierte das Infarktvolume, verbesserte das neurologische Outcome und verminderte die Akkumulation von Makrophagen und aktivierter Mikroglia, sowie die Expression von COX-1 und -2 in neuronalen Zellen und die Induktion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α im ischämischen Gewebe (Zhao et al. 2006, Zhao et al. 2005, Patzer et al. 2008, Glatz et al. 2010, Culman et al. 2012). Eine neuroprotektive Wirkung wurde auch nach der ICV-Applikation des natürlichen PPAR- γ -Agonisten 15-d-PGJ₂ beobachtet (Lin et al. 2006).

In vitro Versuche zeigen weitere Mechanismen der Neuroprotektion durch eine PPAR- γ -Aktivierung. Es konnte nachgewiesen werden, dass PPAR- γ -Agonisten den exzitotoxisch-induzierten Zelltod in neuronalen Zellkulturen verhindern. Darüber hinaus verhindern sie die Freisetzung neurotoxischer Substanzen aus Makrophagen und Mikroglia. Zusätzlich kann der beobachtete neuroprotektive Effekt der Glitazone durch eine Regeneration der neuronalen Funktionen nach Ischämie gesteigert sein (Culman et al. 2007, Zuhayra et al. 2011).

In wenigen Studien wurden die PPAR- γ -Agonisten nach dem ischämischen Ereignis systemisch appliziert. Auch hier zeigte sich ein verbesserter neurologischer Status der Tiere nach Insult und ein vermindertes Schlaganfallvolumen (Sundararajan et al. 2005, Tureyen et al. 2007). In einem Übersichtsartikel von 2010 wurden die Ergebnisse einer Metaanalyse aller präklinischen Studien (22 Studien) über die Effekte von Pioglitazon oder Rosiglitazon bei einem experimentellen Schlaganfall in Ratten und Mäusen veröffentlicht (White und Murphy 2010). Die Cochrane Analyse hierzu zeigte, dass beide TZDs das Schlaganfallvolumen reduzierten und die neurologischen Defizite verminderten, unabhängig von der verwendeten Dosis, dem Applikationsmodus, dem Zeitpunkt der Behandlung oder dem ischämischen Modell (permanente oder transiente Okklusion). Ein wichtiges Ergebnis der Studie war, dass eine Vorbehandlung mit den TZDs nicht unbedingt erforderlich für eine Neuroprotektion ist (White und Murphy 2010). Zwei spätere Berichte haben diese Schlussfolgerung bestätigt, obwohl die Ergebnisse dieser Studien nicht ganz einstimmig waren (Allahtavakoli et al. 2009, Gamboa et al. 2010). Darüber hinaus bieten die TZDs, insbesondere weil sie als Antidiabetika bereits im klinischen Alltag zugelassen und gut verträglich sind, einen interessanten Therapieansatz bei akuten und chronischen neurodegenerativen Prozessen, wie zum Beispiel Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und dem ischämischen Schlaganfall (Gamboa et al. 2010, Culman et al. 2007, Sundararajan et al. 2005).

1.4 Fragestellung

In unserem Institut konnte durch mehrere tierexperimentelle Studien, bei denen eine zerebrale Ischämie herbeigeführt wurde, bereits gezeigt werden, dass die Behandlung mit TZDs eine Verringerung des Infarktolumens und eine Verbesserung des neurologische Outcome erbringen kann (Zuhayra et al., 2011; Glatz et al., 2010; Patzer et al., 2008; Culman et al., 2007; Zhao et al., 2006; Zhao et al., 2005). Diese Daten wurden durch mehrere weitere Studien in anderen Laboratorien, die anstelle des Pioglitazons auch andere TZDs einsetzten,

bestätigt. In den meisten Studien wurden die TZDs systemisch oder intrazerebroventrikulär vor- oder während der zerebralen Ischämie verabreicht. In den wenigen Studien, in denen Pioglitazon oder Rosiglitazon nach ischämischen Ereignis verabreicht wurden, waren die Ergebnisse jedoch nicht eindeutig. Dies lag an verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel der variablen Dauer der arteriellen Okklusion oder dem Fehlen eines klar definierten Zeitpunktes für den Therapiebeginn mit unterschiedlichen Dosen der TZDs. Die zu kleine Anzahl an Versuchstieren schwächte ebenso die Aussagekraft (Allahtavakoli et al. 2009, Gamboa et al. 2010, Ji et al. 2009, Tureyen et al. 2007, Wang et al. 2009).

In der vorliegenden Studie wurde ein Therapieansatz untersucht, der eine bessere klinische Einsetzbarkeit des Medikaments vorsieht, nämlich der Effekt von systemisch verabreichtem Pioglitazon in der post-ischämischen Reperfusionphase auf das Outcome einer fokalen zerebralen Ischämie bei Ratten. Der Insult wurde durch die Okklusion der Arteria cerebri media (middle cerebral artery occlusion, MCAO) für 90 Minuten an normotensiven männlichen Wistar-Ratten induziert. Die subktane Behandlung mit Pioglitazon (2,5 oder 10 mg/kg KG) wurde 3 Stunden nach MCAO begonnen, also somit zu dem Zeitpunkt, an dem eine Thrombolyse mit rtPA nach Zulassungskriterien durchgeführt wird. Die Behandlung mit dem PPAR- γ -Agonisten wurde über 2 oder 5 Tage zweimal täglich weitergeführt. Die jeweiligen Kontrollgruppen wurden auf gleiche Weise mit Vehikel behandelt. Die Anzahl der Versuchstiere in den einzelnen Gruppen variierte zwischen 14 und 20 Tieren um eine ausreichende statistische Aussagekraft der gewonnenen Daten zu erreichen (Dirnagl 2006). Der neurologische Status der Tiere wurde unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Untersuchungsmethoden einmal täglich durch einen unabhängigen Prüfer erhoben (Bederson et al. 1986, Garcia et al. 1995). In einem separaten Experiment wurden wichtige physiologische Parameter im Blut, sowie der Verlauf von kardiovaskulären Faktoren (Blutdruck und Herzfrequenz) vor, während und bis zu 24 Stunden nach der fokalen zerebralen Ischämie ermittelt. Die Größe des Infarktvolumens und des Ödems wurde in jeder experimentellen Gruppe bestimmt. Aus Proben, die vom frontoparietalen Kortex am Rande des Ischämiekerns 48 Stunden nach dem Insult entnommen wurden, wurde die Akkumulation der aktivierten Mikroglia und Makrophagen quantifiziert und die Anzahl der COX-2-, TNF- α -, aktivierte Caspase-9- und PARP p85-Fragment-exprimierenden Zellen bestimmt. Neurodegenerative und neuroregenerative Prozesse, letztere anhand der Färbung des β III-Tubulins, wurden an Gehirnschnitten untersucht, die 5 Tage nach der Induktion der Ischämie entnommen worden sind. Die gegenwärtige Schlaganfallstudie ist die einzige Einfachblindstudie, die bezüglich

der Randomisierung, statistischer Aussagekraft, Bestimmung des Schlaganfallvolumens und neurologischen Status, sowie der Ermittlung der physiologischen Parameter den meisten Punkten der STAIR- und RIGOR- Kriterien entspricht (Liu et al. 2009a, Lapchak et al. 2013).

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 220 und 250 g aus der Züchtung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Kiel) verwendet. Die Ratten wurden stets unter kontrollierten Bedingungen, bei einer Temperatur von 25° mit einer Luftfeuchtigkeit von 60% und einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden, gehalten. Des Weiteren hatten die Tiere jederzeit freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Alle Versuche wurden entsprechend den Richtlinien der Ethik-Kommission Schleswig-Holstein für Tierversuche durchgeführt (Aktenzeichen: V312-72241.121-22 (55-5/07)).

2.2 Operationstechniken

2.2.1 Implantation von Sonden zur Messung der Hirndurchblutung

Bei allen operativen Eingriffen wurde die Narkose mit intraperitoneal applizierter 4%-iger Chloralhydrat-Lösung (400 mg/kg KG) durchgeführt.

4% Chloralhydrat-Lösung (400 mg/kg KG): 4 g Chloralhydrat (Merck, Darmstadt) wurden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst.

Der Kopf der narkotisierten Ratte wurde mit einem stereotaktischen Gerät (David Kopf Instruments, Tujunga USA) fixiert und die Kopfhaut mit einer medialen Inzision aufgetrennt, sodass der Schädel freigelegt wurde. Um eine komplette Darstellung des benötigten Schädelareals zu ermöglichen, wurde das überschüssige Bindegewebe mit einer feinen Schere und einem in Wasserstoffperoxid getränkten Wattestäbchen entfernt. Für die optimierte Blutflussmessung wurde 6,0 mm lateral rechts der Mittellinie und 1,0 mm kaudal von Bregma unter Verwendung eines feinen Bohrers eine leichte Einkerbung in den Knochen gebohrt. Hier

wurde dann eine Plastikhülse mit einem inneren Durchmesser von 1 mm mit Zahnzement fixiert. Zusätzlich wurde eine Schraube im hinteren linken Bereich des Schädels vorsichtig befestigt, um eine ausreichende Sicherung der Sondenhalterung zu erreichen. In die Plastikhülsen wurden dann die Sonden für die Ermittlung der zerebralen Durchblutung platziert.

Während der MCAO wurde unter Nutzung eines Laser-Dopplers (Periflux System 5000 von Perimed, Järfälla Schweden) die regionale zerebrale Durchblutung (regional cerebral blood flow, rCBF) kontinuierlich gemessen. Es wurde darauf geachtet, dass der ipsilaterale Blutfluss während der MCAO um mindestens 75% des Ausgangswertes abfiel. Die Tiere, bei denen kein ausreichender Blutflussabfall erzielt werden konnte, wurden aus der Versuchsreihe ausgeschlossen.

2.2.2 Verschluss der Arteria cerebri media

Mithilfe einer Heizdecke wurde die Körpertemperatur der Ratte während der Operation konstant bei 37° C erhalten. Der chirurgische Eingriff wurde mit Hilfe eines Operationsmikroskops (Wild M3Z Mikroskop von Leica Mikrosysteme, Wetzlar) zur deutlichen Darstellung und Identifizierung aller Strukturen durchgeführt.

Es wurde ein circa 2 cm langer Schnitt medial am Hals der Ratte gesetzt und die Arteria carotis communis mit begleitender Vena jugularis interna und dem Nervus vagus freigelegt. Es folgte die Präparation bis zur Darstellung des Abgangs der Arteria carotis externa. Dieser wurde mit einer 4/0 Naht ligiert. Nach Isolierung der Arteria carotis interna proximal bis zum Canalis carotis wurde auch die Arteria carotis communis ligiert. Aufgrund der außerordentlichen Kollateralversorgung des Rattengehirns führt dies noch nicht zu einer Ischämie. Der Blutfluss der Arteria carotis interna wurde mit einem gespannten Faden am distalen Ende unterbrochen und eine kleine Inzision darunter gesetzt. Hierüber wurde ein speziell hergestelltes Okklusions-Filament eingeführt und circa 17mm (am Silikonfaden markiert) weit bis in die Arteria cerebri media (ACM) vorgeschoben. Dies verursachte dann einen Abfall des zerebralen Blutflusses im rechten frontoparietalen Kortex (mindestens 25% des Ausgangswerts). Für die Okklusion der ACM wurden wiederverwendbare Okklusions-filamente der Firma Docol Corporation, Sharon MA USA (Diameter 0,37-0,39 mm, 403745PK5 Re oder 403945PK5Rem) verwendet. Der Okklusions-Faden wurde in dieser Position für 90 Minuten mit einer Ligatur fixiert. Nach Ablauf der 90 Minuten wurde das

Monofilament wieder vollständig entfernt und die Ligatur zugezogen, um Blutungen aus der Inzisur zu vermeiden. Hierdurch kam es durch Kollateralen zur Reperfusion des betroffenen Hirnareals. Nach Entfernung aller anderen Operationsinstrumente wurde die Haut chirurgisch wieder verschlossen.

Eine Versuchsgruppe wurde keiner zerebralen Ischämie unterzogen, sondern nur *sham*-operiert. Bei diesen Tieren wurde unter Narkose der Halsschnitt und die Freilegung der Arterie durchgeführt, jedoch hat hier keine Okklusion der ACM stattgefunden. Die Wunde wurde nach 90 Minuten wieder vernäht.

2.2.3 Implantation des Femoralkatheters

Zwei Tage vor dem Verschluss der ACM wurde, unter Anästhesie mit Chloralhydrat (400 mg/kg KG, i.p.), ein Polyethylenkatheter (pp-50) mithilfe eines Operationsmikroskops über die Arteria femoralis in die Aorta abdominalis vorgeschoben. Dieser Katheter wurde mit Kochsalz-Heparin-Lösung gefüllt, über einen subkutanen Tunnel am Nacken der Ratte herausgeführt und dort fixiert. Der Katheter wurde verwendet um die kardiovaskulären Parameter aufzuzeichnen, und um Blutproben zu entnehmen.

2.3 Messung der kardiovaskulären Parameter

2.3.1 Messung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) und der Herzfrequenz (HF)

Die Messungen erfolgten über den Femoralkatheter. Dafür wurde ein Druckwandler (Smiths Industries Medical System Company, PVB Medizintechnik GmbH, Kirchseeon, Germany) mit einem Gould Brush Druckprozessor verbunden, welcher an einen Gould Brush Recorder 2400 angeschlossen war. Das analoge Ausgangssignal des Prozessors wurde digitalisiert und konnte mit einem speziellen Computerprogramm bearbeitet werden. Die Messung wurde begonnen wenn der MAP stabil war. Nach Messung des Ausgangswertes wurde die Ratte mit Chloralhydrat (400 mg/kg KG, i.p.) narkotisiert und gewartet, bis sich der Blutdruck erneut stabilisiert hatte. Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden der MAP und die HF kontinuierlich vor und während MCAO, sowie bis zu 330 min nach dem Beginn der

Reperfusion aufgezeichnet. Außerdem erfolgte eine erneute Messung des MAP und der HF an wachen Tieren 24 Stunden nach MCAO.

2.3.2 Messung der physiologischen Parameter im Blut

Über den Katheter wurden zu folgenden Zeitpunkten jeweils 200 µl Blut während der Untersuchung entnommen:

- 1) Vor Einleitung der Anästhesie, unter Ruhebedingungen
- 2) 10 Minuten nach Anästhesie, vor MCAO
- 3) 30 Minuten nach Beginn der MCAO
- 4) 90 Minuten nach Beginn der MCAO
- 5) 30 Minuten nach Beginn der Reperfusion

Die Blutproben wurden mit einem GEM Premier 4000 (Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim bei München, Deutschland) untersucht und pH, pO₂, pCO₂, sowie die Natrium-, Kalium-, Chlorid-, Calcium-, Glukose-, und Laktat-Konzentrationen im Blut bestimmt.

2.4 Neurologische Untersuchung

Die Erfassung und Auswertung des neurologischen Status wurde 24 Stunden nach Verschluss der ACM durchgeführt und danach alle 24 Stunden für insgesamt jeweils 2 oder 5 Tage. Sie erfolgte gemäß dem unten aufgeführten Schema von Bederson et al. (1986) und Garcia et al. (1995) durch einen unvoreingenommenen Prüfer.

2.4.1 Beurteilung des neurologischen Status nach Bederson et al. (1986)

Bei dieser Methode wird beobachtet, ob es zu einer kontralateral zur betroffenen Hemisphäre liegenden Flexion der Vorderpfote, einem Widerstand auf seitlichen Druck, und schließlich einer kreisenden Bewegung der Ratte, kommt. Diese Tests wurden nacheinander durchgeführt. Wenn die Ratte in einem Schritt das zu untersuchende Merkmal oder Benehmen vorwies, aber in dem Folgenden nicht, wurde sie nach dem vorhergehenden Schritt eingestuft. Die Ratten die kein erkennbares neurologisches Defizit aufwiesen wurden auf Grad 0

eingestuft. Den schwersten neurologischen Schaden wiesen die Ratten vor, die sich im Kreis drehten, eine Flexion der Vorderpfote zeigten und auf seitlichen Druck keinen Widerstand entgegensetzen konnten. Diese wurden dann auf Grad 3 eingestuft.

2.4.2 Erfassung des neurologischen Status nach Garcia et al. (1995)

1) Spontanaktivität

In einem ruhigen Raum wurde die Ratte in ihrem Käfig, nachdem der Käfigdeckel abgenommen wurde, nach Akklimatisierung, für 5 Minuten beobachtet. Ihre spontane Aktivität wurde beurteilt, wobei besonders auf die Bewegung zu den vier Wänden des Käfigs geachtet wurde. Die Ratte erhielt 3 Punkte, wenn sie sich umherbewegte, ihre Umgebung explorierte und sich wenigstens drei Wänden des Käfigs zuwendete; 2 Punkte, wenn es sich um eine leicht betroffene Ratte handelte, die sich zwar bewegte, aber sich nicht allen Seiten des Käfigs näherte, auch wenn sie eventuell wenigstens einen oberen Rand des Käfigs erreichte; 1 Punkt, wenn es sich um eine stark beeinträchtigte Ratte handelte, die sich kaum bewegte; 0 Punkte, wenn die Ratte sich gar nicht bewegte.

2) Bewegungssymmetrie der vier Gliedmaßen

Die Ratte wurde am Schwanz gegriffen und in die Luft gehoben. Die Bewegung der vier Gliedmaßen wurde in Bezug auf die Symmetrie begutachtet. Die Ratte erhielt 3 Punkte, wenn sich alle Gliedmaßen symmetrisch bewegten; 2 Punkte, wenn sich die Gliedmaßen auf der kontralateralen Seite weniger oder langsamer bewegten als auf der ipsilateralen Seite; 1 Punkt, wenn auf der kontralateralen Seite nur minimale Bewegungen zu beobachten waren; 0 Punkte, wenn sich die kontralaterale Vorderpfote überhaupt nicht bewegte.

3) Bewegungssymmetrie der Vorderpfoten

Die Ratte wurde erneut an ihrem Schwanz hochgehoben und die symmetrische Laufbewegung der vorderen Pfoten beim Aufsetzen auf die Tischkante beobachtet. Die Ratte erhielt 3 Punkte, wenn beide Pfoten ausgestreckt werden konnten und der Gang symmetrisch war; 2 Punkte, wenn die kontralaterale linke Seite weniger ausgestreckt wurde als die ipsilaterale rechte und somit ein ungleiches Gangbild entstand; 1 Punkt, wenn sich die kontralaterale Seite nur minimal bewegte; 0 Punkte, wenn die kontralaterale Pfote sich gar nicht bewegte.

4) Klettern

Die Ratte wurde auf das Käfiggitter gesetzt und es wurde beobachtet, ob sie in ihrer Greiffähigkeit und beim Klettern eingeschränkt war. Bei dem Versuch die Ratte an ihrem Schwanz vom Gitter weg zu ziehen wurde ihre Kraft beurteilt. Die Ratte erhielt 3 Punkte, wenn sie ohne Probleme und mit zielgerichteten Bewegungen am Gitter hochklettern konnte und sich mit beiden Vorderpfoten gut am Gitter festklammern konnte; 2 Punkte, wenn die linke Seite beim Klettern weniger häufig und stark eingesetzt wurde; 1 Punkt, wenn sie nicht klettern konnte oder sich in kreisenden Bewegungen fortbewegte und sich nicht am Gitter festkrallen konnte.

5) Körper-Propriozeption

Die Reaktion auf Berührung mit einem Holzstäbchen an der linken und rechten Seite der Ratte wurde beobachtet. Die Ratte erhielt 3 Punkte, wenn sie beidseitig auf den Stimulus mit der gleichen Kopfbewegung reagierte; 2 Punkte, wenn sie auf der linken Seite nur langsam auf den Reiz reagierte; 1 Punkt, wenn sie überhaupt nicht reagierte.

6) Tastaar-Sensibilität

Die Tastaare (Vibrissae) der Ratten wurden auf jeder Seite von hinten nach vorne (zur Vermeidung einer Reaktion auf den optischen Reiz) mit einem Holzstäbchen berührt und ihre Reaktion beobachtet. Die Ratte erhielt 3 Punkte, wenn sie beidseitig gleich mit einer Kopfbewegung auf den Reiz reagierte; 2 Punkte, wenn sich eine verlangsamte Reaktion auf der linken Seite zeigte; 1 Punkt, wenn die Ratte keinerlei Reaktion auf den Stimulus auf der linken Seite zeigte.

Die Spontanaktivität, die Bewegungssymmetrie der vier Gliedmaßen und die Bewegungssymmetrie der Vorderpfoten wurden mit einer Punktzahl von 0 bis 3 bewertet. Das Klettern, die Körper-Propriozeption und die Tastaar-Sensibilität wurden mit je 1 bis 3 Punkten benotet. Durch die Addition dieser Punkte wurde das Ausmaß des neurologischen Defizits in Werten zwischen 3 und 18 quantifiziert. Hierbei entsprach eine Gesamtpunktzahl von 3 der stärksten neurologischen Beeinträchtigung der Ratte durch den Schlaganfall, während eine Gesamtpunktzahl von 18 Punkten einer vollkommen gesunden, neurologisch uneingeschränkten Ratte gleichkam.

Tabelle 1: Zusammenfassung der neurologischen Untersuchung nach Garcia et al. (1995)

	0	1	2	3
Spontanaktivität	Keine Bewegung, starke Beeinträchtigung	Kaum Bewegung mäßige Beeinträchtigung	Keine Bewegung zu allen vier Wänden möglich	Bewegung zu allen vier Wänden möglich, keine Beeinträchtigung
Bewegungs-symmetrie aller Gliedmaßen	Keine Bewegung der linken Gliedmaße	Wenig Bewegung der linken Gliedmaße	Langsame Bewegungen der linken Gliedmaße	Symmetrische Bewegung aller Gliedmaßen
Bewegungs-symmetrie der Vorderpfoten	Keine Streckbewegungen der linken Vorderpfote möglich	Streckversuche der linken Vorderpfote	Ungleiches Gangbild durch verringerte Streckung der linken Vorderpfote	Symmetrische Streckbewegungen der Vorderpfoten
Klettern		Kein Klettern möglich/ kreisende Bewegungen	Eingeschränkte Kletterfähigkeit durch erschwertes Greifen links	Normale Kletterfähigkeit
Körper-Propriozeption		Keine Reaktion der linken Seite	Linksseitig schwache Reaktion	Symmetrische Reaktion
Tasthaar-Sensibilität		Keine Reaktion der linken Seite	Linksseitig schwache Reaktion	Symmetrische Reaktion
Summe:				

2.5 Entnahme der Gehirne

2 bzw. 5 Tage nach zerebraler Ischämie wurden die Ratten mit einer Überdosis Chloralhydrat-Lösung narkotisiert. Nach Eröffnen des Brustkorbes wurde das Herz freigelegt und über den linken Ventrikel eine Kanüle eingeführt. Über diese wurde zuerst 100 ml gekühlte PBS und dann 100 ml 4 % Paraformaldehyd-Lösung transkardial perfundiert. Es folgte die Entnahme des Gehirns aus dem Schädel und dessen Fixierung in 4% Paraformaldehyd-Lösung über 24 Stunden sowie die anschließende Lagerung bei 4° C in 30% Saccharose-Lösung über 3 Tage zum Flüssigkeitsentzug. Danach wurde das Gehirn in Trockeneis gefroren und mithilfe des CM3050 S Cryostat (Leica Mikrosysteme, Wetzlar) bei -20° C in 8 oder 40 µm serielle

Scheiben auf Höhe Bregma + 4.0 mm bis Bregma – 7.0 mm geschnitten. Jeder 20. Schnitt wurde für die Bestimmung des Infarkt volumens verwendet. Drei aufeinanderfolgende Schnitte (40 µm) im Bereich der vorderen Kommissur (Bregma ±0) wurden für die immunhistochemische Aufarbeitung post-ischämischer Entzündungsprozesse (aktivierte Mikroglia/Makrophagen, COX-2, TNF-α) und Apoptose (aktivierte caspase-9, PARP p85-Fragmente) im frontoparietalen peri-infarkt Areal verwendet.

10 x PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung): 80 g NaCl wurde mit 11,5 g Na₂HPO₄ sowie 2 g KH₂PO₄ und 2 g KCl in 800ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl- oder NaOH-Lösung auf 7,4 eingestellt und die Lösung mit destilliertem Wasser auf eine Menge von 1000ml aufgefüllt. Eine 1:10 Verdünnung dieser Lösung wurde für die Versuchsreihe benutzt (1xPBS).

4% Paraformaldehyd-Lösung: 40g Paraformaldehyd wurden bei 60° C in 900ml PBS gelöst. Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1000 ml aufgefüllt.

30% Saccharose-Lösung: 30g Saccharose wurden mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 100ml aufgefüllt.

2.6 Infarktvolumen und Ödembildung

2.6.1 Bestimmung des Infarktvolumens mittels Kresylviolett-Färbung

Zur Bestimmung des Infarktvolumens wurden die Gehirnschnitte, die 2 Tage nach MCAO entnommen wurden, mittels Kresylviolett gefärbt. Hierzu wurden 15 der entnommenen Schnitte in gleichen Abständen über eine Gesamtdistanz von 40 µm zuerst für 1 min in destilliertem Wasser gewaschen und dann mit 96% Ethanol dehydriert. Mit Xylol wurden sie über 15 min entfärbt und erneut inkubiert erst mit 96% Ethanol für 1 min und anschließend mit destilliertem Wasser für 1 min. Danach wurden die Schnitte für 15 min in 0,1%-Kresylviolett gefärbt. Sie wurden kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 1% Essigsäure in Ethanol gespült. Schließlich wurde der Farbstoff aus dem Infarktbereich mit destilliertem Wasser heraus gespült und die Schnitte auf Gelatine-beschichtete Objektträger platziert.

2.6.2 Bestimmung des Infarktvolumens mittels Fluoro-Jade C-Färbung

Da die Infarktvolumenbestimmung mittels Kresylviolett-Färbung bei den Gehirnen, die 5 Tage nach MCAO entnommen wurden, keine einheitlichen Ergebnisse erbrachte, wurden diese Schnitte mit der Fluoro-Jade C-Lösung bearbeitet. Ausführliche Untersuchungen haben gezeigt, dass die Fluoro-Jade Farbstoffe als fluoreszierende Liganden spezifisch an neuronale Soma und Neuriten binden, die sich in der Degenerationsphase befinden. Dadurch kann eine zuverlässige Trennung der anatomischen Grenzen zwischen Ischämiekern und Penumbra dargestellt werden (Liu et al. 2009b). Von den drei verschiedenen Farbstoffen, Fluoro-Jade, Fluoro-Jade B und Fluoro-Jade C hat der letzte die größte Affinität zu degenerierenden Neuronen, und erreicht somit die beste Darstellung des betroffenen Areals. Da dieser Farbstoff nur degenerative Neurone färbt, besteht keine Gefahr für falsch positive Ergebnisse. Weitere Vorteile sind die niedrigen Mengen an Färbemittel die benötigt werden, sowie die kurze Zeit, in der Ergebnisse erreicht werden können, die sogar ein Jahr später die gleiche Signalstärke aufweisen (Schmued et al. 2005).

Die angefertigten Schnitte (nach beiden Färbemethoden) wurden eingescannt und mit dem Leica Image Analysis System (Leica Mikrosysteme, Wetzlar) untersucht. Um das Infarktvolumen zu bestimmen, wurden in den einzelnen Schnitten die Infarktareale ausgemessen. Das Infarktvolumen berechnete sich dann durch die Multiplikation der Summe der Infarktfläche und der Distanz zwischen den einzelnen Schnitten. Durch die Ausmessung und Bestimmung der Differenz zwischen den ipsilateralen und kontralateralen Hirnhemisphären wurde die Größe des Hirnödems bestimmt. Anschließend wurde das Infarktvolumen gemäß der Größe des Ödems oder der Schrumpfung korrigiert, und mit Hilfe der Formel von Swanson et al. (1990) wurde das vom Infarkt betroffene Areal in Bezug auf das Ödem und mögliche Schrumpfungprozesse in Gehirnen, welche 5 Tage nach MCAO entnommen wurden, zu beobachten sind, in Prozent berechnet.

2.7 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Nachweise wurde aufgrund seiner hohen Sensitivität die indirekte ABC- (Avidin-biotinylisierter Enzym-Komplex) Methode (Vectastain ABC peroxidase Kit, Vector Laboratories, Burlingame) benutzt, um anhand einer enzymkatalysierten Reaktion die gewünschten Strukturen (Substrat), die mit einem zuvor farblosen

Chromogen kombiniert sind, sichtbar zu machen. Als Chromogen wurde 3,3'-Diaminobenzidin (3,3'-DAB) verwendet. Ein spezifischer Antikörper (der sogenannte Primärantikörper), der ein oder mehrere Epitope der zu erkennenden Proteine erfasst und spezifisch daran bindet, wird mit einem korrespondierenden Enzym-gekoppelten Antikörper (dem Sekundärantikörper) kombiniert. Dieser reagiert mit dem Substrat unter Bildung eines Farbstoffs an der Stelle, an der die Enzymreaktion stattgefunden hat.

In diesem Fall basiert die Immunlabelling (also die Immunmarkierungs)-Reaktion auf der hohen Affinität von Avidin zu Biotin. Avidin ist ein tetrameres, basisches Glykoprotein und wird aus Hühnereiweiß gewonnen. Es besitzt vier spezifische Biotin-Bindungsstellen. Es wird darüber hinaus in zahlreichen biochemischen Methoden benutzt, da es einfach mit verschiedenen Markern, wie Enzymen oder Fluoreszenzfarbstoffen, versehen werden kann. Biotin, ein wasserlösliches Vitamin, auch als Vitamin B₇ bekannt, bildet die prothetische Gruppe von Carboxylase-Enzymen. Biotin wird vor allem für die Immunhistochemie genutzt, da es an größere Moleküle (wie zum Beispiel Antikörper oder Enzyme) gekoppelt (sogenannte biotinylierung) werden kann und deren Eigenschaften dabei nicht verändert. Die Bindung von Biotin an Avidin wird als eine der stärksten, natürlichen nicht-kovalenten Bindungen betrachtet.

2.7.1 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

PBST: 100 ml 10 x PBST wurde 3 ml Triton X-100 Surfactant hinzugefügt und mit destilliertem Wasser auf eine Menge von 1000ml aufgefüllt.

ABC-Lösung: Aus dem Vectastain ABC peroxidase Kit (Vector Laboratories, Burlingame) wurden zwei Tropfen der Reagenz A mit 5 ml PBST gemischt und daraufhin 2 Tropfen von Reagenz B hinzugefügt. Anschließend musste die Mischung 30 min bis zum Gebrauch ruhen.

DAB-Lösung: Aus dem Kit D 4418 (Sigma, Steinheim) wurde eine 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid Tablette (eine Tablette enthält 10 mg DAB) mit einer Tablette Wasserstoffperoxid in 15 ml destilliertem Wasser gelöst.

In der indirekten ABC-Methode wird zuerst der spezifische Primärantikörper an den entsprechenden Liganden gebunden, dann der biotinylierte Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper ist Enzym-gekoppelt, in diesem Falle mit einer Peroxidase, wobei das Enzym wiederum mit Avidin markiert ist. Beide werden mit dem Substrat, hier Wasserstoff-

peroxid, kombiniert, sodass die frei werdenden Wasserstoff-Protonen, das zuvor annähernd farblose 3,3'-DAB oxidieren und dieses sich braun verfärbt.

Um die gelagerten Gehirnschnitte vom Paraformaldehyd zu reinigen, wurden sie dreimalig mit kaltem PBST für jeweils 5 min gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 0,1% Triton Natriumcitrat für 5 min und anschließend wurde die gesamte Flüssigkeit abgesaugt. Durch Anwendung einer 100:1 Methanol und 30% Wasserstoffperoxid-Lösung für 10 min wurde die endogene Peroxidase gesättigt. Die Schnitte wurden erneut zweimal mit PBST für 10 min gewaschen und anschließend in 2% Eseserum (in PBST gelöst) als Blockpuffer für 60 min inkubiert. Dies dient zur Blockade interferierender Proteine. Die Schnitte wurden nochmals in PBST für 10 min gewaschen und dann mit dem Primärantikörper inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit PBST für 10 min wurden die nicht-gebundenen Antikörper entfernt. Nun wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (der zuvor nach Anweisung der Hersteller bei 37°C verdünnt wurde) dazugegeben und die Schnitte bei 37° für 45 min inkubiert. Mithilfe des Vectastain ABC peroxidase Kit (Vector Laboratories, Burlingame) wurde die Avidin-gekoppelte Peroxidase an den Sekundärantikörper gebunden. Es folgte das zweimalige Waschen mit PBST für jeweils 5 min und einmal für 10 min und das Zufügen von DAB-Lösung für 20 min. Durch die Addition von 0,2% Wasserstoffperoxid kam es zu einer Braunfärbung der gewünschten Strukturen. Schließlich wurden eine kurze und dann zweimal eine 10-minütige Spülung mit destilliertem Wasser durchgeführt und anschließend die Präparate getrocknet. Dann wurden sie auf Objektträger gelegt, kurz in Xylol getaucht und mit Pertex (Medite, Burgdorf) abgedeckt. Zur Ermittlung der Anzahl der positiv-gefärbten Zellen wurde die Leica image analysing software (Leica Qwin) benutzt.

Zur Bestimmung der Entzündungsparameter wurde ein Teil der Schnitte mit monoklonalem mouse anti-rat ED-1 Antikörper (1:300, Serotec, Düsseldorf), der spezifisch für aktivierte Mikroglia/Makrophagen ist, sowie mit COX-2-spezifischem polyklonalem rabbit anti-rat COX-2 Antikörper (1:600, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) und TNF- α -spezifischem polyklonalem rabbit anti-rat TNF- α Antikörper inkubiert.

Zur Evaluierung der apoptotischen Prozesse im Infarktgebiet wurde ein Teil der Schnitte mit polyklonalem rabbit anti-rat cleaved caspase-9 Antikörper (1:100, Cell Signal Technology, Danvers, MA, USA), spezifisch für aktivierte Caspase-9-positive Zellen und ein weiterer Teil mit PARP p85-Fragment-spezifischem polyklonalem rabbit anti-rat PARP p85-fragment Antikörper (1:100, Promega GmbH, Mannheim) inkubiert.

Zur Quantifizierung des neuronalen Zerfalls in Form von degenerativen neuronalen Soma und Neuriten wurden Schnitte mit der oben beschriebenen Fluoro-Jade C-Färbung behandelt.

Die neuronale Regeneration wurde anhand von Schnitten, die mit Neuronen-spezifischem rabbit anti-rat β III-Tubulin Antikörper (1:1500, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) inkubiert wurden, beurteilt.

Studien konnten zeigen, dass es bei einer verminderten Expression von β III-Tubulin zu einem verminderten Verhältnis von Neuriten zu Zellkörpern von bis zu 40% kommt, und es sich dementsprechend als zuverlässiger Marker für die neuronale Regeneration eignet (Guo et al. 2010).

2.8 Versuchsprotokolle

Vorversuch: Effekte einer einmaligen und wiederholten systemischen

Behandlung mit Pioglitazon auf den Glukosespiegel im Blut

(a) Vehikel (n = 8) oder verschiedene Dosen von Pioglitazon (1; 2,5; 5 und 10 mg/kg KG) (n = 7-9) wurden Ratten subkutan injiziert und der Glukosespiegel im arteriellen Blut über einen Zeitraum von 5 Stunden bestimmt.

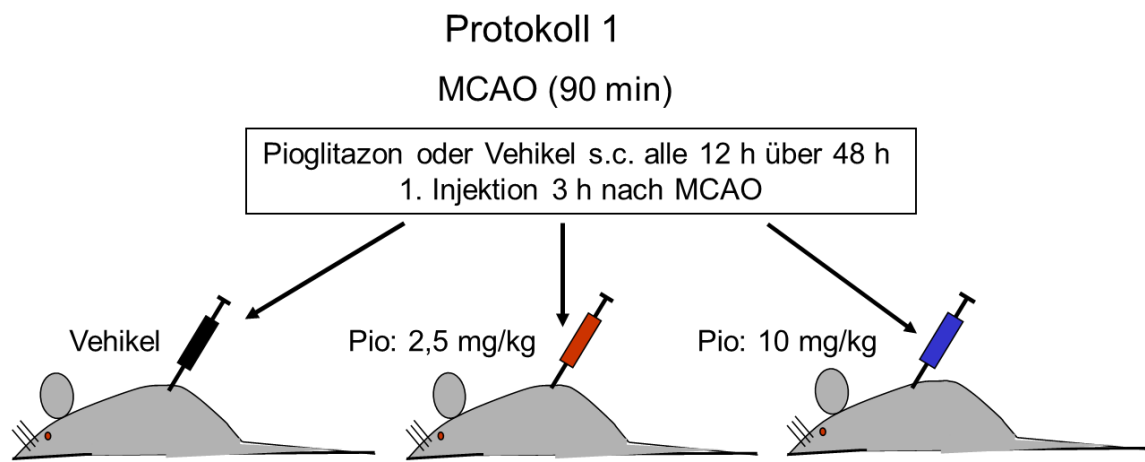
(b) Ratten wurden mit Vehikel (n = 9) oder Pioglitazon 2,5 mg/kg KG (n = 8) oder 10 mg/kg KG (n = 6) jede 12 Stunden an 2 aufeinander folgenden Tagen subkutan behandelt. Am 3. Tag wurde Vehikel oder Pioglitazon noch einmal subkutan injiziert und der Glukosespiegel im arteriellen Blut über einen Zeitraum von 5 Stunden bestimmt.

Protokoll 1: Effekte der systemischen Behandlung mit Pioglitazon in der frühen Phase (2 Tage) nach ischämischem Schlaganfall

Durch die Okklusion der ACM (zusammen MCAO) für 90 Minuten und anschließender Reperfusion wurde eine fokale zerebrale Ischämie induziert. Der regionale zerebrale Blutfluss (rCBF) wurde in allen Ratten gemessen und schließlich wurden nur die Ratten für die Behandlung mit Pioglitazon verwendet, in denen der rCBF während der ersten 30 Minuten der MCAO auf 25% oder weniger des Basalwertes reduziert war. Diese Ratten wurden in eine Behandlungs- und eine Placebo-Gruppe randomisiert und zweimal täglich subkutan mit Vehikel (n=14), mit 2,5 mg/kg KG (n=14) oder 10 mg/kg KG (n=14) Pioglitazon behandelt.

Dies wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen durch einen verblindeten Mitarbeiter durchgeführt. Um die Effekte einer hohen Dosis des Pioglitazons auf die motorischen und sensorischen Funktionen bei Ratten ohne Schlaganfall zu untersuchen, wurden auch *sham*-operierte Ratten mit jeweils Vehikel (n=12) oder 10 mg/kg KG Pioglitazon (n=8) subkutan behandelt.

Abbildung 1: Versuchsablauf und untersuchte Parameter im Protokoll 1



Untersuchte Parameter:

Neurologischer Status: 24 und 48 h nach MCAO

Infarktvolume, Ödemvolumen: 48 h nach MCAO

Immunhistochemische Untersuchung (Aktivierte Mikroglia/Makrophagen; COX-2; TNF- α , aktivierte Caspase – 9; PARP p85 Fragment)

Die erste Injektion von Pioglitazon oder Vehikel erfolgte 3 Stunden nach Beginn der MCAO. Dies bedeutet, dass Pioglitazon oder Vehikel 90 Minuten nach Beginn der Reperfusion injiziert wurden. Der neurologische Status der Tiere wurde einmal 24 Stunden und einmal 48 Stunden nach MCAO erhoben. Schließlich wurden die Tiere durch eine tiefe Narkose getötet und ihre Gehirne für die Auswertung des Infarktvolume, der Ödemausbreitung und für die immunhistochemische Untersuchungen der Mikroglia/Makrophagen-Akkumulation, der Anzahl der COX-2, TNF- α , aktivierter Caspase-9 und PARP-p85-Fragment positiver Zellen, entnommen (Vehikel n=8, Pioglitazon 2,5 mg/kg KG n=8, Pioglitazon 10 mg/kg KG n=10).

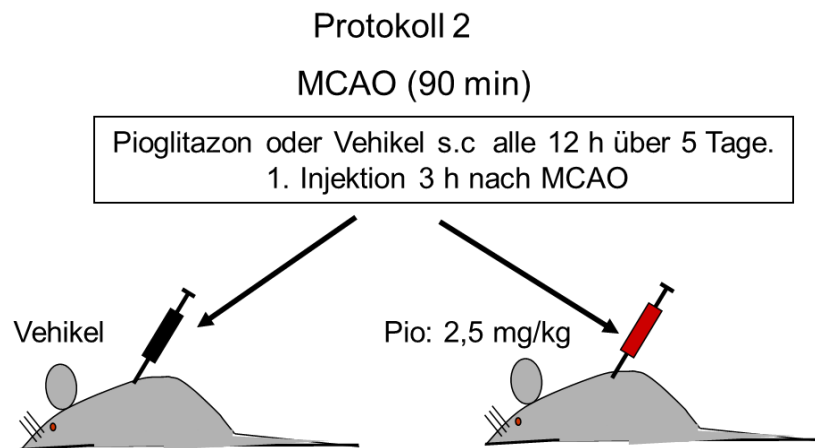
Zusätzlich wurde eine separate Versuchsreihe aufgestellt, in der die physiologischen Parameter vor, während und nach der Ischämie bestimmt wurden. Dies wurde bei Ratten durchgeführt, die in der Phase nach Ischämie entweder Vehikel (n=9) oder Pioglitazon 10

mg/kg KG (n=10) erhielten. Die kardiovaskulären Parameter, wie der systolische und diastolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden bei wachen, nicht-narkotisierten Ratten am Tag des Experiments aufgezeichnet. Eine Blutprobe (200 µl) zur Bestimmung der physiologischen Blutparameter wurde entnommen. Weitere Blutentnahmen erfolgten an narkotisierten Tieren kurz vor der Operation und anschließend jede Stunde während und nach der MCAO bis zu 7 Stunden nach Beginn der Ischämie. Der Blutdruck und die Herzfrequenz wurden kontinuierlich bis zu 7 Stunden nach Beginn der Operation gemessen. Die rCBF wurde bei allen Tieren vor- und während der MCAO aufgezeichnet. Drei Stunden nach Beginn der MCAO wurden die Ratten randomisiert mit Vehikel oder Pioglitazon 10 mg/kg KG behandelt. 24 Stunden nach dem ischämischen Insult wurden schließlich erneut die kardiovaskulären und physiologischen Parameter im Blut der Ratten bestimmt.

Protokoll 2: Effekte der systemischen Behandlung mit Pioglitazon in der späten Phase (5 Tage) nach ischämischem Schlaganfall

Da das Infarktvolume und die Ödemausbreitung signifikant kleiner waren in den Ratten, die mit der niedrigeren Dosis Pioglitazon (2,5 mg/kg KG) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen behandelt worden waren, als in denen, die der höheren Dosis (10 mg/kg KG) ausgesetzt worden waren, wurde die niedrigere Dosis für die letzte Versuchsreihe verwendet. Den Ratten dieser Versuchsreihe wurde wieder durch einen verblindeten Mitarbeiter zweimal täglich Vehikel (n=18) oder 2,5 mg/kg KG Pioglitazon (n=20) subkutan für 5 aufeinanderfolgende Tage verabreicht. *Sham*-operierte Ratten wurden entweder mit Vehikel (n=14) oder 2,5 mg/kg KG Pioglitazon (n=8) behandelt.

Abbildung 2: Versuchsablauf und untersuchte Parameter im Protokoll 2



Untersuchte Parameter:

Neurologischer Status am 1., 2., 3., 4. und 5. Tag nach MCAO,

Infarktvolumen, Ödemvolumen: 5 Tage nach MCAO

Immunhistochemische Untersuchung (aktivierte Mikroglia/Makrophagen; neuronale Degeneration; neuronale Regeneration) 5 Tage nach MCAO

Auch hier wurde die Therapie 3 Stunden nach Beginn der Operation begonnen. Die erste Erhebung des neurologischen Status der Ratten erfolgte 24 Stunden nach MCAO und dann jeden weiteren Tag für insgesamt 5 Tage. Am 5. Tag wurden die Ratten wieder durch eine tiefe Narkose getötet und ihre Gehirne für die Bestimmung des Infarktvolumens und der Ödemgröße entnommen. Außerdem wurden Schnitte zur immunhistochemischen Auswertung der Anzahl aktivierter Mikroglia/Makrophagen im kortikalen Gewebe am Rande des Ischämiekerns (Vehikel n=10, Pioglitazone n=11) und für die Beurteilung der Neurodegeneration (Vehikel n=12, Pioglitazon n=14) und Neuroregeneration (Vehikel n=9, Pioglitazon n=8) angefertigt.

2.9 Statistische Analyse

Alle Werte werden als Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) dargestellt. Die statistische Auswertung der Veränderungen in den rCBFs, den physiologischen Variablen im Blut und den kardiovaskulären Parametern erfolgte durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde die Verteilung der Daten in Bezug auf das Infarktvolumen und die Ödemgröße bestimmt, während der Bartlett's-Test angewandt wurde, um die Gleichheit der Standardabweichungen (SD) zu testen. Der nicht-parametrische

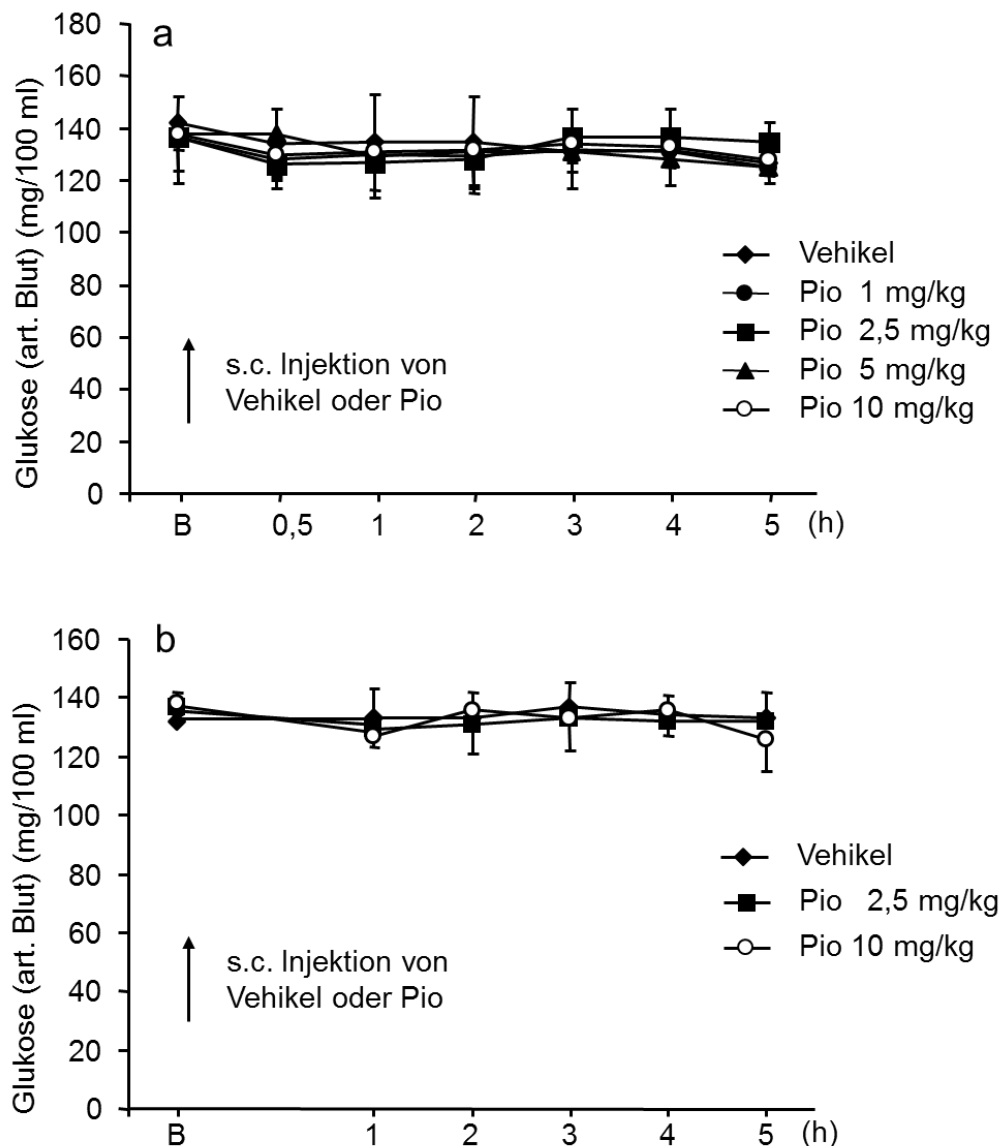
Kruskal-Wallis- Test und der Mann-Whitney-Test wurden benutzt, um die Effekte von Vehikel oder Pioglitazon auf das Infarktvolumen und die Ödemgröße zu analysieren. Die Daten aus dem Protokoll 1 wurden auch mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend mit dem post-hoc Bonferroni-Test analysiert, während die Daten aus Protokoll 2 durch den Student's t-Test beurteilt wurden. Diese Tests konnten durchgeführt werden, da sich eine Gauß'sche Verteilung der Daten darstellte und Bartlett's - Test gezeigt hat, dass sich die errechneten Standardabweichungen (SD) in ihrer Signifikanz nicht unterschieden. Eine zweifaktorielle ANOVA gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test wurde für die statistische Analyse der Unterschiede zwischen den neurologischen Defiziten der *sham*-operierten, sowie der Vehikel- und Pioglitazon-behandelten Ratten nach MCAO angewandt. Zur statistischen Analyse der Effekte von Vehikel oder Pioglitazon auf die Anzahl von aktivierten Mikroglia/Makrophagen und auf die Anzahl COX-2-, TNF-alpha-, cleaved caspase-9- und PARP p85 fragment-positiven Zellen wurden ANOVA und der post-hoc Bonferroni-Test angewandt. Schließlich ermöglichte der Student's t-Test für ungepaarte Proben einen Vergleich der Daten über die Akkumulation von aktivierten Mikroglia/Makrophagen im 5-Tages Experiment, der Neurodegeneration (Fluoro-Jade C-Färbung) und der Neuroregeneration (β III-Tubulin-Färbung) bei der Vehikel- und Pioglitazon-behandelten Gruppen. Bei allen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ akzeptiert.

3. Ergebnisse

3.1 Effekte einer einmaligen und wiederholten systemischen Behandlung mit Pioglitazon auf den Glukosespiegel im Blut

Die Auswirkungen der systemischen Behandlung mit Pioglitazon auf den Blutzuckerhaushalt in Ratten sind auf der Abb. 3 dargestellt. Über einen Zeitraum von 5 Stunden hatten weder eine einzelne Injektion (a) noch die wiederholte Behandlung mit verschiedenen Dosen von Pioglitazon (b) einen Einfluss auf die Glukosekonzentration im arteriellen Blut. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Pioglitazon bei nicht-diabetischen Ratten keine Hypoglykämie induziert.

Abbildung 3



Erklärung Abbildung 3: Gezeigt wird der Zeitverlauf der Glukosekonzentrationen im arteriellen Blut der Ratte nach einer Einzelinjektion von verschiedenen Dosen von Pioglitazon (Pio) (a) und nach chronischer Behandlung mit dem PPAR γ -Agonist auf zwei aufeinander folgenden Tagen (b). Kontrolltiere wurden subkutan mit Vehikel behandelt. B: Basalwerte der Glukosekonzentration im Blut, ermittelt vor der Injektion von Vehikel oder Pioglitazon. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Injektion. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede während des ganzen Zeitverlaufs der Glukosekonzentrationen im Blut festgestellt (zweifaktorielle Varianzanalyse).

3.2 Protokoll 1: Effekte der systemischen Behandlung mit Pioglitazon in der frühen Phase (2 Tage) nach ischämischem Schlaganfall

3.2.1 Regionaler zerebraler Blutfluss (rCBF) während MCAO und in der Reperfusionphase

Während der MCAO sank der rCBF in allen Gruppen unter 25 % der Basalwerte. Die Reduktion der rCBF war in allen drei Versuchsgruppen identisch. Nach Entfernung des Monofilaments stieg der ipsilaterale rCBF in allen Versuchsgruppen auf ca. 75 – 85 % der Basalwerte an (Tabelle 2).

Tabelle 2: Veränderungen des rCBF in der Ischämiezone während der 90-minütigen Okklusion der ACM und während der Reperfusionphase

Behandlung	10 min MCAO	30 min MCAO	60 min MCAO	30 min Reperfusion
Vehikel	16 \pm 10	18 \pm 8	24 \pm 9	84 \pm 30
Pioglitazon 2,5 mg/kg KG	17 \pm 10	20 \pm 10	21 \pm 9	78 \pm 31
Pioglitazon 10 mg/kg KG	16 \pm 7	22 \pm 7	25 \pm 8	83 \pm 22

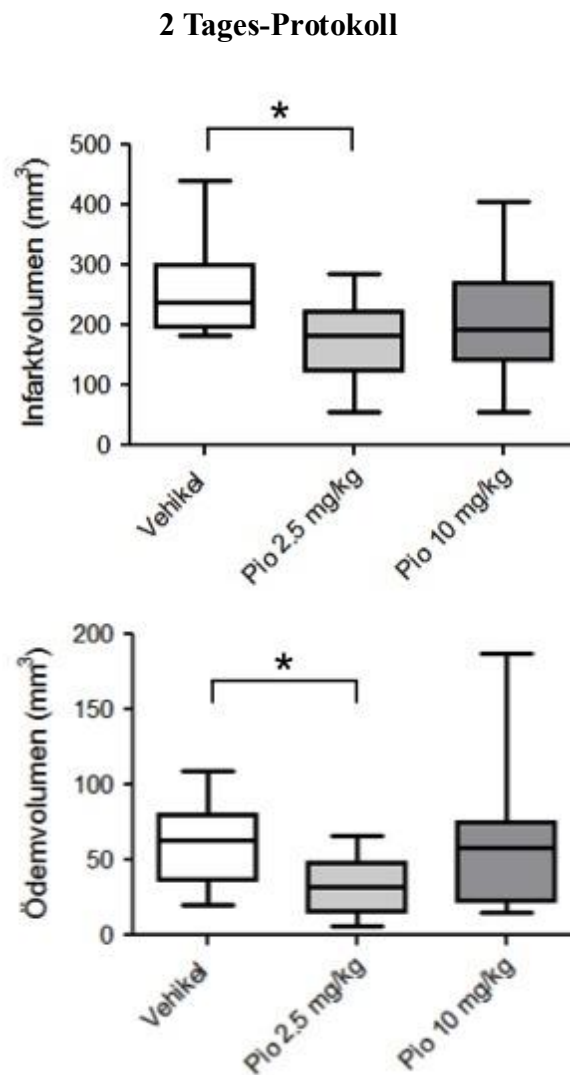
Tabelle 2: Gezeigt wird der rCBF während MCAO über insgesamt 90 min und nach Reperfusion in Ratten die post-ischämisch mit Vehikel (n=14) oder Pioglitazon (2,5 mg/kg KG, n=14, oder 10 mg/kg

KG, n=14) an 2 aufeinander folgenden Tagen behandelt wurden. Der rCBF (Mittelwert \pm SD) ist als Prozentsatz des Ausgangswertes (100%, ermittelt vor der Ligatur der Arteria carotis communis) dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der rCBF zwischen Vehikel- und Pioglitazon-behandelten Ratten festgestellt (zweifaktorielle Varianzanalyse).

3.2.2 Infarktvolumen und Ödem

Mithilfe der Kresylviolet-Färbung, welche eine optimale Abgrenzung des Infarktbereichs vom normalen Gewebe erlaubt, konnte in den Ratten, die an 2 aufeinander folgenden Tagen behandelt wurden, die Größe des ischämischen Areals dargestellt, gemessen und berechnet werden. In den Ratten, die mit Vehikel behandelt wurden, führte die Okklusion der Arteria cerebri media für 90 min zu einem großen hemisphärischen Infarktvolumen von durchschnittlich 250 mm³. Die ischämische Läsion lokalisierte sich im frontoparietalen und frontotemporalen Kortex, sowie in Segmenten des lateralen und des medialen Nucleus caudatus. Die Behandlung mit 2,5 mg/kg KG Pioglitazon bewirkte eine signifikante Verminderung des Infarktvolumens um ca. 31% (P = 0,042) und des Ödems um ca. 43% (P = 0,048) im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren. Die Behandlung mit 10 mg/kg KG Pioglitazon reduzierte die Infarktgröße und das Infarktvolumen nicht signifikant um ca. 18% (Abbildung 4).

Abbildung 4



Erklärung Abbildung 4: Infarkt volumen (obere Graphik) und Ödem (untere Graphik) bei Ratten, die 2 Tage nach MCAO mit Vehikel (weiße Säulen, $n = 14$), Pioglitazon 2,5 mg/kg KG (hellgrau Säulen, $n = 14$) oder Pioglitazon 10 mg/kg KG (dunkelgrau Säulen, $n = 14$) behandelt wurden. $*P < 0,05$, statistische Vergleiche mit der Vehikel-behandelten Gruppe, berechnet mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-test.

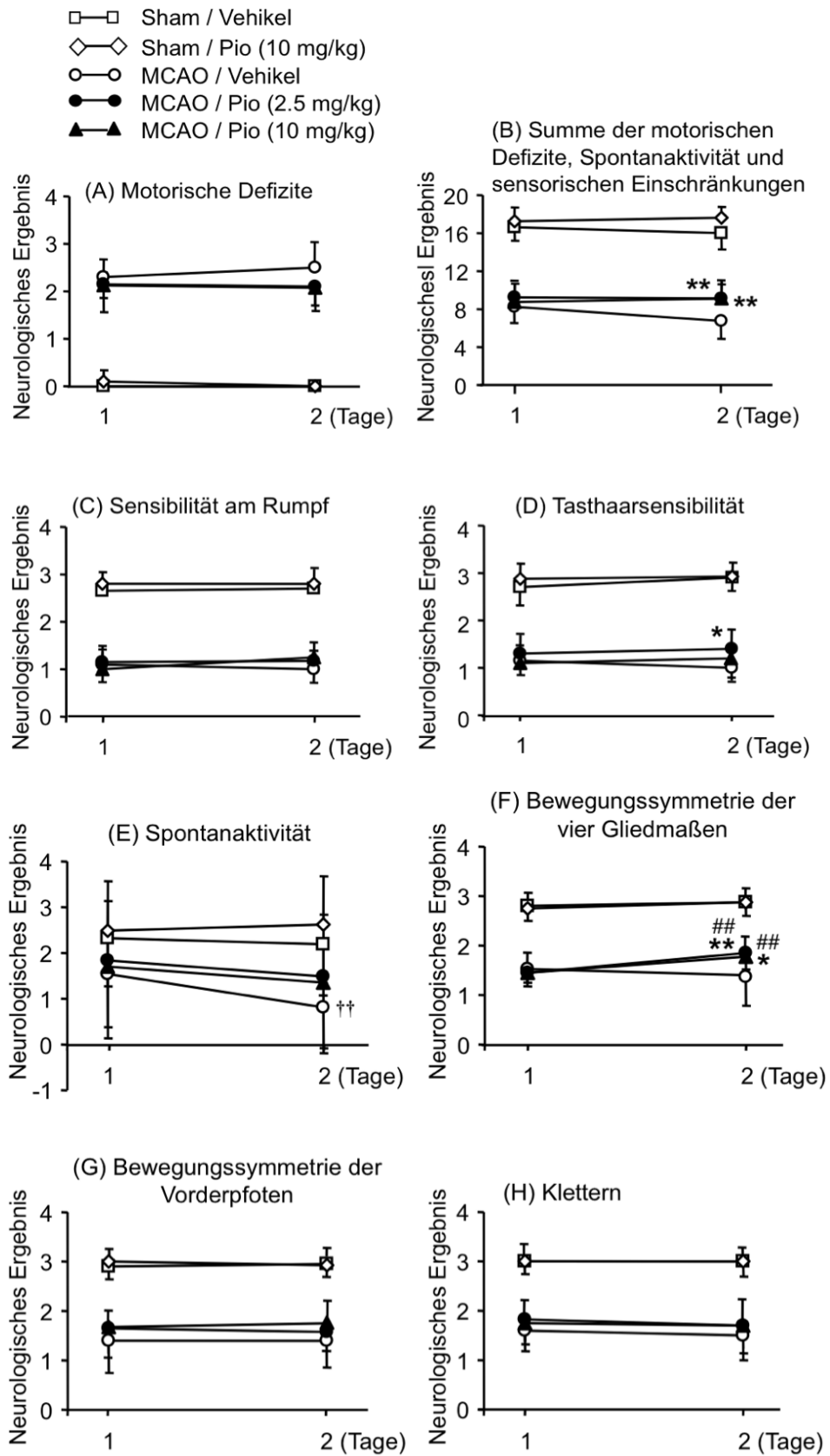
3.2.3 Neurologischer Status

Vehikel vs. Pioglitazon bei sham-operierten Ratten: Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied im neurologischen Outcome zwischen sham-operierten, Vehikel-behandelten Ratten und denen, die mit 10 mg/kg KG Pioglitazon behandelt wurden, festgestellt werden (Abbildung 5).

Sham-Operation vs. MCAO: Bei Ratten, bei denen eine MCAO durchgeführt wurde, war der neurologische Defizit deutlich ausgeprägter als bei den *sham*-operierten Ratten, die entweder mit Vehikel oder 10 mg/kg KG Pioglitazon behandelt wurden ($P < 0,001$, Signifikanz nicht angezeigt)(Abbildung 5 A-D und F-H). Ausgenommen war hiervon die Spontanaktivität, die bei den mit Pioglitazon-behandelten Schlaganfall-Ratten keine Unterschiede zu den sham-operierten Tieren aufwies (Abbildung 5E).

Vehikel vs. Pioglitazon: Nach MCAO zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen Vehikel- und Pioglitazon-behandelten Ratten im Bereich der motorischen Defizite (Bederson et al., 1986) (Abbildung 5A). Vier der Vehikel-behandelten Ratten litten unter sehr ausgeprägten neurologischen Defiziten und der Gesamtscore der neurologischen Untersuchung (Garcia et al., 1995) am 2. Tag nach MCAO war bei den Vehikel-behandelten Ratten deutlich schlechter als bei den Pioglitazon-behandelten Ratten (Abbildung 5B). Die Auswertung der sensorischen Defizite der Ratten zeigte keine statistischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen nach Ischämie (Abbildung 5 C und D). Eine Ausnahme war die Sensibilität der Tastaare, welche bei der 2,5 mg/kg KG Pioglitazon-behandelten Gruppe am 2. Tag eine Verbesserung zeigte (Abbildung 5 D). Im Bereich der symmetrischen Bewegung aller Gliedmaßen ergab sich bei der Vehikel-Gruppe am 2. Tag eine schlechtere Bewertung als am 1. Tag (Abbildung 5 F). Die mit Pioglitazon-behandelten Versuchstiere zeigten weniger Defizite bei der Bewegungssymmetrie der vier Gliedmaßen am 2. als am 1. Tag. Beide Gruppen von Tieren, die mit Pioglitazon behandelt wurden, entwickelten weniger Defizite als diejenigen der Vehikel-Gruppe (Abbildung 5 F). Im Bereich der Bewegungssymmetrie der Vorderpfoten und des Kletterns ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Vehikel-behandelten und Pioglitazon-behandelten Ratten (Abbildung 5 G und H).

Abbildung 5



Erklärung Abbildung 5: Neurologischer Status bei sham-operierten Ratten, die mit Vehikel (n=12, weiße Quadrate) oder Pioglitazon 10 mg/kg KG (n=8, weiße Rauten) behandelt wurden, sowie Ratten, die einer 90-minütigen MCAO ausgesetzt wurden und in der Reperfusionphase mit Vehikel (n=14, weiße Kreise), Pioglitazon 2,5 mg/kg KG (n=14, schwarze Kreise), oder Pioglitazon 10 mg/kg KG (n=14, schwarze Dreiecke) behandelt wurden A: Gesamtscore der motorischen Defizite nach Bederson et al. (1986)

B - H: Bewertung der neurologischen Defizite (Garcia et al. 1995). Gesamtscore der motorischen und sensorischen Defizite und der Spontanaktivität (B), neurologischer Score der sensorischen Defizite (C und D), der Spontanaktivität (E), der Bewegungssymmetrie der vier Gliedmaßen (F), der Bewegungssymmetrie der Vorderpfoten (G) und des Kletterns (H). Die Ratten ohne neurologische Defizite wurden mit 3 Punkten- und stark eingeschränkte Tiere mit 0 oder 1 Punkt bewertet. Spontanaktivität: ^{††} P<0,01, Vergleich mit sham-operierten Ratten behandelt mit Vehikel oder Pioglitazon; Sensorische und motorischen Defizite: ^{###} P<0,01, statistischer Vergleich mit dem Score am 1.Tag nach MCAO; * P<0,05 und ** P<0,01, statistischer Vergleich mit den Vehikel-behandelten Tieren am 2. Tag nach MCAO, (zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Bonferroni –test).

3.2.4 Immunhistochemische Untersuchung

Zwei Tage nach dem fokalen ischämischen Schlaganfall wurde am Rand des nekrotischen Gewebes eine deutlich erhöhte Akkumulation von aktivierten Mikroglia/Makrophagen beobachtet. Die Behandlung mit 2,5 mg/kg KG Pioglitazon hat die Infiltration des peri-Infarktgewebes durch aktivierte Mikroglia/Makrophagen deutlich vermindert ($F_{2,21} = 3,684$, $P = 0,04$; Tabelle 2). Dies konnte nicht bei den Ratten gezeigt werden, die mit 10 mg/kg KG Pioglitazon behandelt wurden. Zwischen der Vehikel-Gruppe und den beiden Versuchsgruppen, die mit Pioglitazon behandelt wurden, konnte kein Unterschied bei der Dichte der COX-2- ($F_{2,21} = 0,191$, $P = 0,62$), TNF- α - ($F_{2,21} = 0,886$, $P = 0,42$) exprimierenden Zellen und der apoptotischen Zellen (PARP p85 fragment-positive Zellen: $F_{2,21} = 2,4/27$, $P = 0,11$ und cleaved caspase-9-positive Zellen: $F_{2,21} = 2,164$, $P = 0,139$) festgestellt werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Immunhistochemische Detektion der Inflammation (aktivierte Mikroglia/Makro-phagen, COX-2 and TNF- α) und Apoptose (cleaved caspase-9 und cleaved PARP p85 fragment) im ischämischen Kortex am 2. Tag nach MCAO bei Ratten behandelt in der Reperfusionphase mit (Vehikel, n=8) oder mit Pioglitazon (Pio; 2.5 und 10 mg/kg KG, n=8).

Parameter	Anzahl an immunreaktiven Zellen/mm ²		
	Vehikel	Pio 2.5 mg/kg KG	Pio 10
Aktivierte Mikroglia/Makrophagen	908 ± 291	542 ± 250*	765 ± 266
COX-2	615 ± 220	616 ± 194	549 ± 203
TNF- α	261 ± 75	246 ± 114	314 ± 118
Cleaved caspase – 9	214 ± 73	255 ± 111	172 ± 56
Cleaved PARP p 85 fragment	238 ± 63	178 ± 55	217 ± 60

Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. Im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren war die Anzahl an aktivierten Mikroglia/Makrophagen bei Ratten, die mit 2.5 mg/kg Pioglitazon (* $P < 0.05$) behandelt wurden, signifikant reduziert (Einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Bonferroni-Test). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl an COX-2-, TNF- α -, cleaved caspase-9- und cleaved PARP p 85 fragment- positiven Zellen zwischen den Vehikel- und Pioglitazon-behandelten Tieren festgestellt.

3.2.5 Mortalität

Innerhalb von 48 Stunden nach MCAO verstarben 5 Ratten der Vehikel-Gruppe, sowie 5 Ratten der mit 2,5 mg/kg KG- und 2 Ratten der mit 10 mg/kg KG Pioglitazon- behandelten Gruppe.

3.2.6 Kardiovaskuläre und physiologische Parameter

Die Aufzeichnung der kardiovaskulären Parameter und die Bestimmung der physiologischen Parameter in Blut wurde bei Ratten durchgeführt, die in der Reperfusionphase entweder mit Vehikel oder mit 10 mg/kg KG Pioglitazon behandelt wurden. Nach Anästhesiebeginn fiel der systolische und diastolische Blutdruck bei beiden Gruppen von Tieren ab. Dieser Abfall des Blutdruckes wurde von einem Anstieg der Herzfrequenz begleitet (Abbildung 6). Beide Parameter blieben nahezu konstant während der Okklusion und in der Reperfusionphase. Über den ganzen Zeitraum waren die gemessenen Werte in beiden Versuchsgruppen identisch (Abbildung 6). In der Reperfusionphase fiel der pH-Wert moderat bei allen Tieren ab. Entsprechend zeigte sich ein Narkose-induzierter Abfall des pO_2 und ein Anstieg des pCO_2 , sowie ein Anstieg von Glukose und Laktat (Tabelle 4, Signifikanz nicht dargestellt). Zum Zeitpunkt der Vehikel- oder Pioglitazongabe, also 90 min nach dem Beginn der MCAO, waren alle physiologischen Variablen im Blut bei beiden Versuchsgruppen identisch. Es gab keine signifikanten Differenzen zwischen Vehikel- und Pioglitazongruppe hinsichtlich pH, Blutgase, Elektrolyte, Laktat, Glukose und Hämatokrit über den ganzen Zeitraum (Tabelle 4).

Abbildung 6

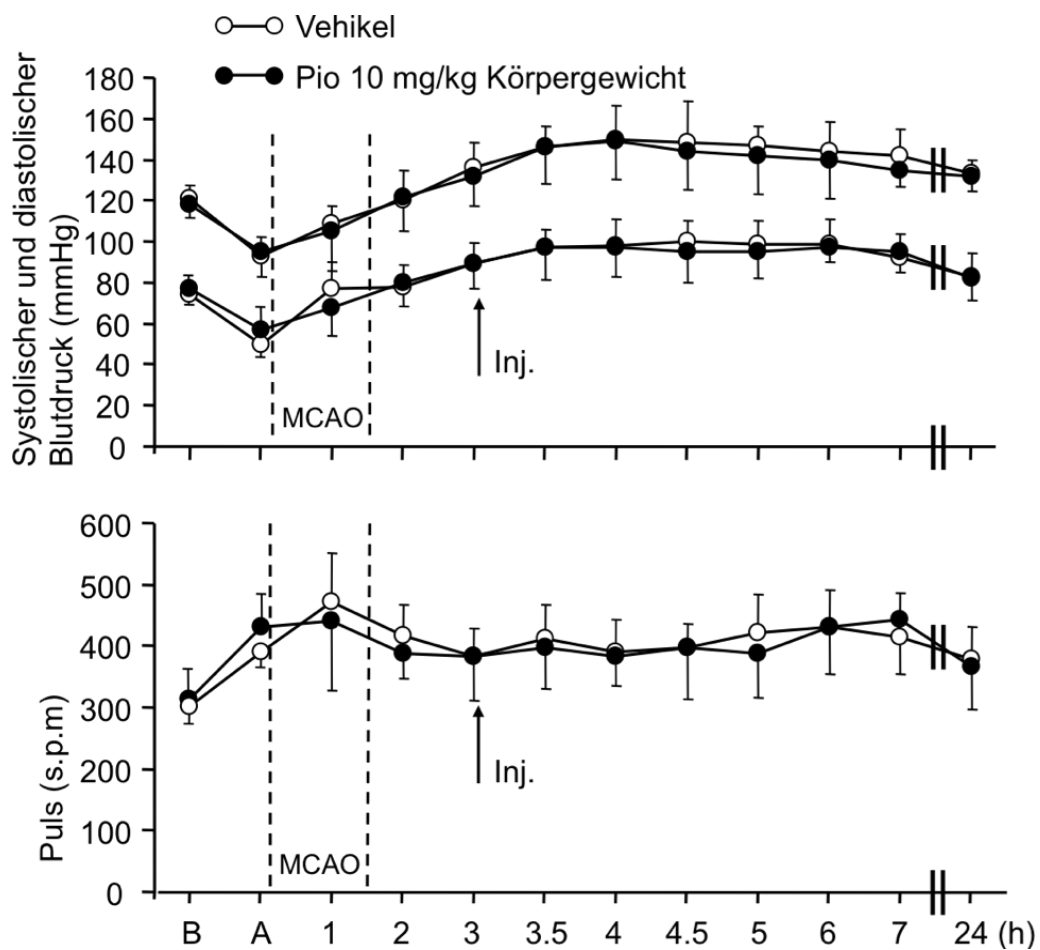


Abbildung 6: Systolischer und diastolischer arterieller Druck (oben) und Herzfrequenz (unten) vor, während der Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO) mit nachfolgender Reperfusion. Die Ratten wurden 3 h nach dem Beginn der Okklusion mit subkutaner Injektion von Vehikel (weiße Kreise, n=9) oder 10 mg/kg KG Pioglitazon (schwarze Kreise, n=10) behandelt. B: wache Ratten, A: Anästhesiebeginn, MCAO: Verschluss der Arteria cerebri media (90 min). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den kardiovaskulären Parametern zwischen Vehikel- und Pioglitazon-behandelten Ratten über den gesamten Zeitraum festgestellt (zweifaktorielle Varianzanalyse).

Tabelle 4: Physiologische Variablen im arteriellen Blut vor, während und nach MCAO bei Ratten, denen subkutan Vehikel (n=9) oder Pioglitazon (10 mg/kg KG)(n=10) in der Reperfusionphase, 90 min nach Beginn der Reperfusion, injiziert wurde.

Parameter	Behandlung	B	A	1h nach MCAO-Beginn	2 h nach MCAO-Beginn	3 h nach MCAO-Beginn
pH	Vehikel	7,53 ± 0,01	7,34 ± 0,05	7,45 ± 0,01	7,45 ± 0,01	7,48 ± 0,03
	Pioglitazon	7,53 ± 0,02	7,369 ± 0,07	7,45 ± 0,04	7,45 ± 0,06	7,49 ± 0,05
pO ₂ (mmHg)	Vehikel	93 ± 5,3	74 ± 11,2	78 ± 9,0	86 ± 4,5	89 ± 5,5
	Pioglitazon	90 ± 8,3	85 ± 6,0	81 ± 7,2	83 ± 15	90 ± 6,6
pCO ₂ (mmHg)	Vehikel	30 ± 4,9	40 ± 4,8	31 ± 3,0	29 ± 3,3	26 ± 4,1
	Pioglitazon	32 ± 2,8	36 ± 3,2	30 ± 3,3	29 ± 7,1	25 ± 4,4
Glukose (mg/dl)	Vehikel	116 ± 23	158 ± 26	147 ± 43	147 ± 42	128 ± 30
	Pioglitazon	126 ± 17	160 ± 18	154 ± 37	156 ± 35	134 ± 14
Laktat (mmol/l)	Vehikel	0,73 ± 0,22	2,92 ± 0,87	1,00 ± 0,23	1,14 ± 0,52	0,78 ± 0,10
	Pioglitazon	0,90 ± 0,20	2,30 ± 1,30	1,18 ± 0,26	1,36 ± 0,78	0,90 ± 0,29
Na ⁺ (mmol/l)	Vehikel	141 ± 1,7	137 ± 3,1	137 ± 3,3	138 ± 3,5	139 ± 3,4
	Pioglitazon	140 ± 3,4	138 ± 2,3	137 ± 3,5	137 ± 2,3	138 ± 2,2
K ⁺ (mmol/l)	Vehikel	3,8 ± 0,7	4,1 ± 0,4	4,0 ± 0,9	3,1 ± 0,5	3,0 ± 0,6
	Pioglitazon	3,8 ± 0,5	4,2 ± 0,4	4,0 ± 0,5	3,2 ± 0,5	3,1 ± 0,4
Cl ⁻ (mmol/l)	Vehikel	108 ± 2,9	104 ± 2,8	107 ± 4,1	107 ± 2,8	109 ± 4,4
	Pioglitazon	106 ± 3,5	106 ± 2,9	106 ± 3,0	107 ± 3,7	108 ± 2,8
Ca ²⁺ (mmol/l)	Vehikel	1,19 ± 0,10	1,14 ± 0,09	1,16 ± 0,11	1,09 ± 0,08	1,09 ± 0,12
	Pioglitazon	1,21 ± 0,07	1,13 ± 0,08	1,16 ± 0,06	1,09 ± 0,12	1,12 ± 0,08
Hämatokrit (%)	Vehikel	36 ± 2,6	36 ± 3,2	36 ± 2,9	35 ± 2,8	34 ± 2,8
	Pioglitazon	35 ± 2,7	34 ± 2,0	34 ± 2,9	35 ± 4,1	34 ± 4,2

Tabelle 4 Fortsetzung

Parameter	Behandlung	4 h nach MCAO-Beginn	5 h nach MCAO-Beginn	6 h nach MCAO-Beginn	7 h nach MCAO-Beginn	24 h nach MCAO-Beginn
pH	Vehikel	7,52 ± 0,04	7,53 ± 0,03	7,54 ± 0,04	7,51 ± 0,06	7,53 ± 0,02
	Pioglitazon	7,52 ± 0,03	7,52 ± 0,03	7,54 ± 0,05	7,52 ± 0,02	7,52 ± 0,07
pO ₂ (mmHg)	Vehikel	89 ± 5,6	90 ± 5,6	90 ± 5,6	88 ± 7,0	86 ± 5,4
	Pioglitazon	91 ± 2,1	91 ± 4,6	91 ± 4,9	90 ± 4,4	88 ± 10
pCO ₂ (mmHg)	Vehikel	23 ± 4,8	23 ± 4,4	22 ± 3,4	25 ± 3,1	28 ± 3,7
	Pioglitazon	23 ± 4,4	24 ± 5,0	22 ± 5,5	23 ± 4,3	27 ± 4,9
Glukose (mg/dl)	Vehikel	131 ± 22	122 ± 31	116 ± 17	113 ± 20	118 ± 16
	Pioglitazon	139 ± 33	131 ± 24	114 ± 18	108 ± 15	122 ± 19
Laktat (mmol/l)	Vehikel	1,06 ± 0,64	1,00 ± 0,35	0,91 ± 0,40	0,96 ± 0,66	1,00 ± 0,40
	Pioglitazon	0,85 ± 0,40	0,83 ± 0,29	0,90 ± 0,49	0,87 ± 0,54	1,10 ± 0,47
Na ⁺ (mmol/l)	Vehikel	140 ± 3,0	141 ± 3,2	142 ± 3,2	141 ± 3,0	143 ± 4,2
	Pioglitazon	139 ± 2,4	140 ± 1,9	142 ± 1,9	142 ± 2,3	143 ± 2,9
K ⁺ (mmol/l)	Vehikel	2,9 ± 0,5	3,0 ± 0,6	2,9 ± 0,4	3,1 ± 0,6	3,3 ± 0,6
	Pioglitazon	3,0 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,0 ± 0,5	3,3 ± 0,5	3,4 ± 0,6
Cl ⁻ (mmol/l)	Vehikel	110 ± 2,8	110 ± 4,0	111 ± 3,1	110 ± 2,1	112 ± 3,6
	Pioglitazon	110 ± 2,7	110 ± 3,0	113 ± 3,0	113 ± 3,2	112 ± 3,8
Ca ²⁺ (mmol/l)	Vehikel	1,09 ± 0,09	1,10 ± 0,12	1,08 ± 0,09	1,11 ± 0,08	1,17 ± 0,11
	Pioglitazon	1,10 ± 0,08	1,10 ± 0,05	1,06 ± 0,08	1,09 ± 0,07	1,15 ± 0,09
Hämatokrit (%)	Vehikel	36 ± 1,3	37 ± 3,9	36 ± 2,1	36 ± 4,5	35 ± 3,5
	Pioglitazon	35 ± 3,0	36 ± 3,3	35 ± 3,0	35 ± 4,9	33 ± 3,8

B: Basalwerte (wache Ratten), A: Anästhesiebeginn. Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD dargestellt. Es liegen keine statistisch signifikanten Unterschiede in den gemessenen Parametern zwischen Vehikel- und Pioglitazon-behandelten Ratten vor (zweifaktorielle Varianzanalyse)

3.3 Protokoll 2: Effekte der systemischen Behandlung mit Pioglitazon in der späten Phase (5 Tage) nach ischämischem Schlaganfall

3.3.1. Regionale zerebrale Durchblutung während MCAO und in der Reperfusionphase

Während der MCAO sank der rCBF in beiden Gruppen unter 25 % der Basalwerte. Die Reduktion der rCBF war in beiden Versuchsgruppen identisch. Nach Entfernung des Monofilaments stieg der ipsilaterale rCBF in allen Versuchsgruppen auf ca. 75 – 80 % der Basalwerte an (Tabelle 5).

Tabelle 5: Regionaler zerebraler Blutfluss während MCAO und in der Reperfusionphase

Behandlung	10 min MCAO	30 min MCAO	60 min MCAO	30 min Reperfusion
Vehikel	14 ± 10	18 ± 11	23 ± 11	77 ± 40
Pioglitazon 2,5 mg/ KG	16 ± 8	21 ± 8	22 ± 9	80 ± 30

Gezeigt wird der regionale zerebrale Blutfluss (rCBF) während der Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO) über insgesamt 90 min und nach Reperfusion in Ratten, die post-ischämisch mit Vehikel (n=18) oder Pioglitazon (2,5 mg/kg KG, n=20) an 5 aufeinander folgenden Tagen behandelt wurden. Der rCBF (Mittelwert ± SD) wird in Prozent der Basalwerte (100%, ermittelt vor der Ligatur der Arteria carotis communis) dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der rCBF zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt (zweifaktorielle Varianzanalyse).

3.3.2 Infarktvolumen und Ödem

Auch in dieser Versuchsreihe reduzierte die Behandlung mit Pioglitazon, im Vergleich zur Vehikel-gruppe, signifikant das Infarktvolumen um 29% (Infarktvolumen in mm³: Vehikel: 177 ± 67, Pioglitazon: 125 ± 52* (* P = 0,045; Mann-Whitney Test). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Größen der Ödemvolumina (Abbildung 7).

Abbildung 7

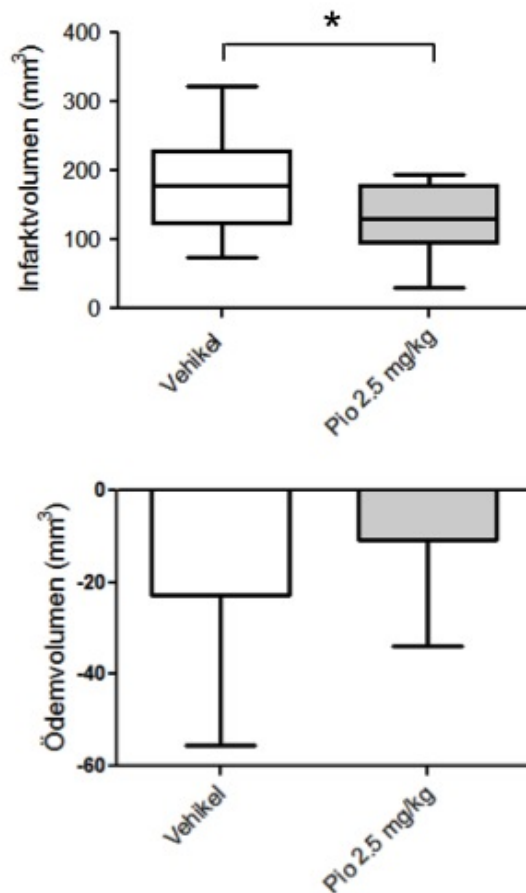


Abbildung 7: Effekte einer 5-tägigen Behandlung mit Vehikel (weiße Säulen, $n = 18$) oder Pioglitazon 2,5 mg/kg KG (hellgrau Säulen, $n = 20$) in der Reperfusionphase auf das Infarktvolumen und das Ödem. Die Daten wurden 5 Tage nach MCAO erhoben. * $P < 0,05$, statistischer Vergleich mit der Vehikel-behandelten Gruppe, berechnet mit nicht-parametrischem Mann-Whitney-tests.

3.3.3 Neurologischer Status

Sham-Operation vs. MCAO: Mit Ausnahme der Spontanaktivität war der neurologische Status bei beiden Gruppen, die den ischämischen Schlaganfall erlitten, deutlich schlechter als bei *sham*-operierten Ratten (Abbildung 8, Signifikanz nicht dargestellt). Wir haben beobachtet, dass sich die Pioglitazon-behandelten Ratten nach MCAO schneller als die Vehikel-behandelten Tiere erholten. Ratten, die nach dem Schlaganfall mit Pioglitazon behandelt wurden, zeigten nach MCAO weniger motorische Beeinträchtigungen am Tag 5 als am Tag 1 (Vehikel: $F_{4,85} = 1,313$, $P = 0,272$; Pioglitazon: $F_{4,95} = 3,336$, $P = 0,0130$, $P < 0,05$) (Abbildung 8A). Trotzdem wurde zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen Vehikel-

und Pioglitazon- behandelten Tieren bezüglich des Gesamtscore der motorischen und sensorischen Ausfälle und der Spontanaktivität festgestellt (Abbildung 8B) (Garcia et al. 1995). Keine Unterschiede wurden in der Rumpfsensibilität bei beiden Versuchsgruppen beobachtet (Abbildung 8C). Dagegen zeigte die Sensibilität der Tasthaare bei der Pioglitazon-Gruppe eine deutliche Verbesserung an den Tagen 4 und 5 gegenüber dem Score am 1. Tag und auch gegenüber dem Score, der bei der Vehikel-Gruppe am Tag 4 und 5 erhoben wurde (Abbildung 8D). Die Spontanaktivität war bei den Vehikel-behandelten Tieren deutlich geringer als bei den *sham*-operierten Ratten zu allen Zeitpunkten, ausgenommen am 2. Tag nach MCAO (Abbildung 8E). Obwohl die Tiere der Pioglitazon-Gruppe sich tendenziell besser erholten, als die Ratten der Vehikel-Gruppe, zeigte sich ihre Spontanaktivität zu keinem Zeitpunkt signifikant besser als bei der Vehikel-Gruppe (Abbildung 8E). Bei den mit Vehikel-behandelten Tiere wurde keine Besserung bezüglich der symmetrischen Bewegung aller Extremitäten beobachtet ($F_{4,85} = 1,875$; $P = 0,122$). Dagegen zeigte die Bewegungssymmetrie bei der Pioglitazon-Gruppe eine deutliche Verbesserung an den Tagen 4 und 5 gegenüber dem 1. Tag ($F_{4,95} = 4,400$; $P = 0,003$) und auch gegenüber dem Score der Vehikel-Gruppe am Tag 5 (Abbildung 8F). Die Gesamtpunktzahlen der Bewegungssymmetrie der Vorderpfoten und des Kletter-Tests bei beiden Versuchsgruppen waren während des gesamten Zeitraums nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 8G, 8H).

Abbildung 8

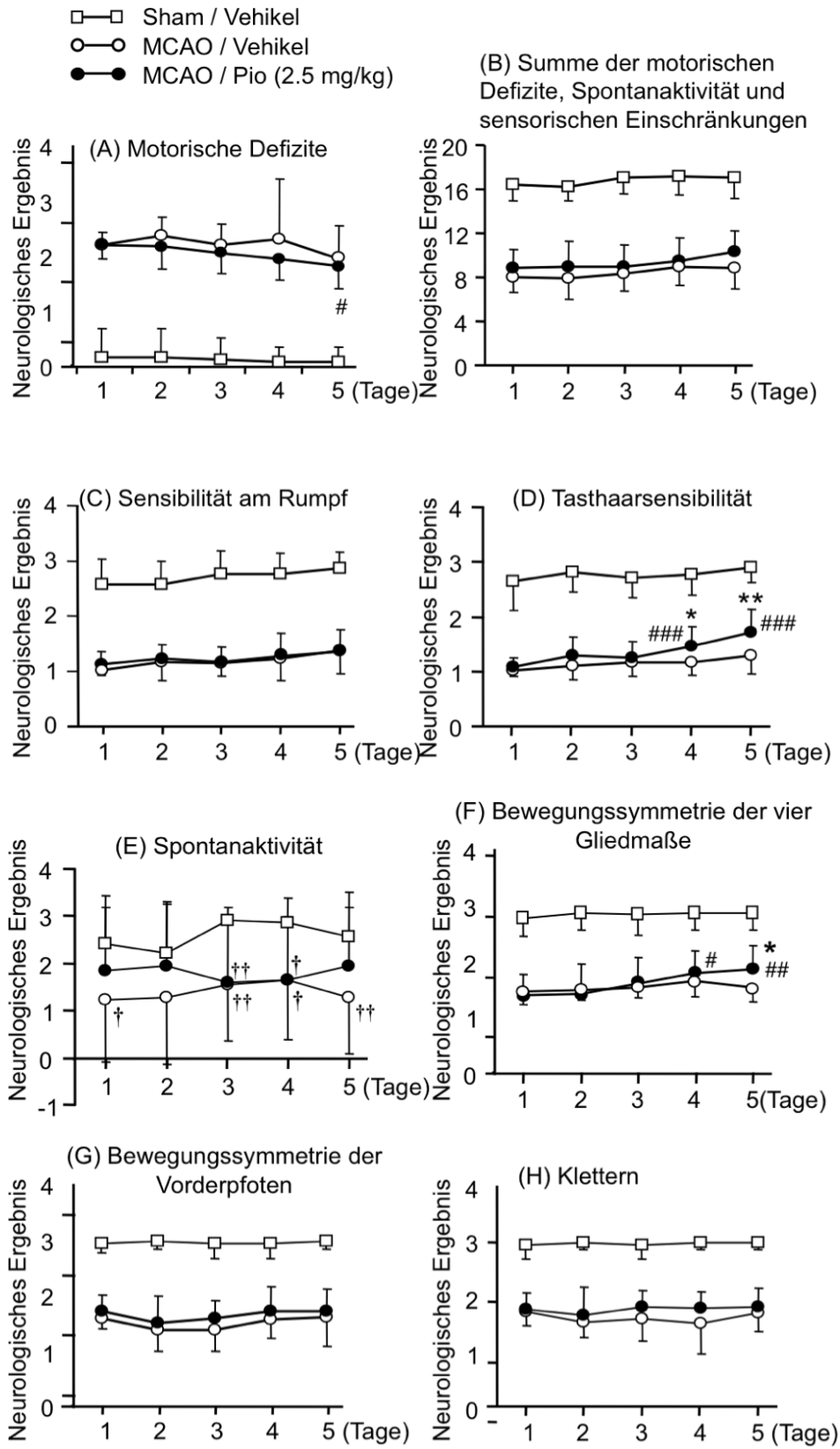


Abbildung 8: Neurologischer Status bei sham-operierten Ratten, die mit Vehikel ($n=14$, weiße

Quadrate) behandelt wurden, sowie bei Ratten, die einer 90-minütigen MCAO ausgesetzt wurden und in der Reperfusionphase mit Vehikel (n=18, weiße Kreise) oder mit Pioglitazon (2,5 mg/kg KG; n=20, schwarze Kreise) behandelt wurden A: Gesamtscore der motorischen Defizite nach Bederson et al. (1986), B - H: Bewertung der neurologischen Defizite nach Garcia et al. (1995). Gesamtscore der motorischen und sensorischen Defizite und der Spontanaktivität (B), neurologischer Score der sensorischen Defizite (C und D), der Spontanaktivität (E), der Bewegungssymmetrie der vier Gliedmaßen (F), der Bewegungssymmetrie der Vorderpfoten (G) und des Kletterns (H). Die Ratten ohne neurologischen Defizite wurden mit 3 Punkten- und stark eingeschränkte Tiere mit 0 oder 1 Punkt bewertet. Im Vergleich zu den sham-operierten Ratten war der neurologische Status beider Schlaganfall-Gruppen deutlich schlechter ($P < 0,001$, Signifikanz nicht dargestellt). Spontanaktivität: $^{\dagger} P < 0,05$ und $^{**} P < 0,01$, Vergleich mit sham-operierten Ratten behandelt mit Vehikel zum entsprechenden Zeitpunkt; Sensorische und motorischen Defizite: $^{\#} P < 0,05$, $^{##} P < 0,01$ und $^{###} P < 0,001$, statistischer Vergleich mit Score, der am 1. Tag nach MCAO ermittelt wurden; $^{*} P < 0,05$ und $^{**} P < 0,01$, statistischer Vergleich mit den Vehikel-behandelten Tieren zu dem jeweiligen Zeitpunkt nach MCAO, (zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Bonferroni –test).

3.3.4 Mortalität

In der Reperfusionphase verstarben 9 der Vehikel-behandelten Ratten und 4 der Pioglitazon-behandelten Ratten. Alle Ratten verstarben innerhalb von 3 Tagen nach MCAO.

3.3.5 Immunhistochemische Untersuchung

Fünf Tage nach MCAO wurde eine ausgeprägte Infiltration des peri-Infarktgewebes und des Infarktzentrums durch aktivierte Mikroglia/Makrophagen beobachtet, wobei die Dichte der reaktiven Mikroglia/Makrophagen in den mit Pioglitazon-behandelten Ratten im Vergleich zur den Vehikel-behandelten Ratten signifikant reduziert war sowohl im Bereich des Ischämiekerns (Dichte/mm²: Vehikel: 810 ± 221 , Pioglitazon: 325 ± 122 ; $t = 6,308$, $P < 0,001$) als auch im peri-Infarktgewebe ($t = 4,698$, $P < 0,001$) (Abbildung 9, links und Abbildung 10). Im ischämischen Gewebe führte die Behandlung mit Pioglitazon zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl der Neurone mit Anzeichen einer Neurodegeneration ($t = 3,785$, $P < 0,001$) (Abbildung 9, Mitte und Abbildung 10). Andererseits konnte anhand der erhöhten Anzahl an Neuronen und Neuriten, die β III-Tubulin exprimierten ($t = 2,793$, $P < 0,05$) (Abbildung 9, rechts und Abbildung 10), gezeigt werden, dass Pioglitazon das neuronale

Überleben und das Nachwachsen der Neuriten im ischämischen Gewebe fördert. Interessanterweise, konnten auch neuronale Zellkörper und Prozesse im ischämischen Kern beobachtet werden.

Abbildung 9

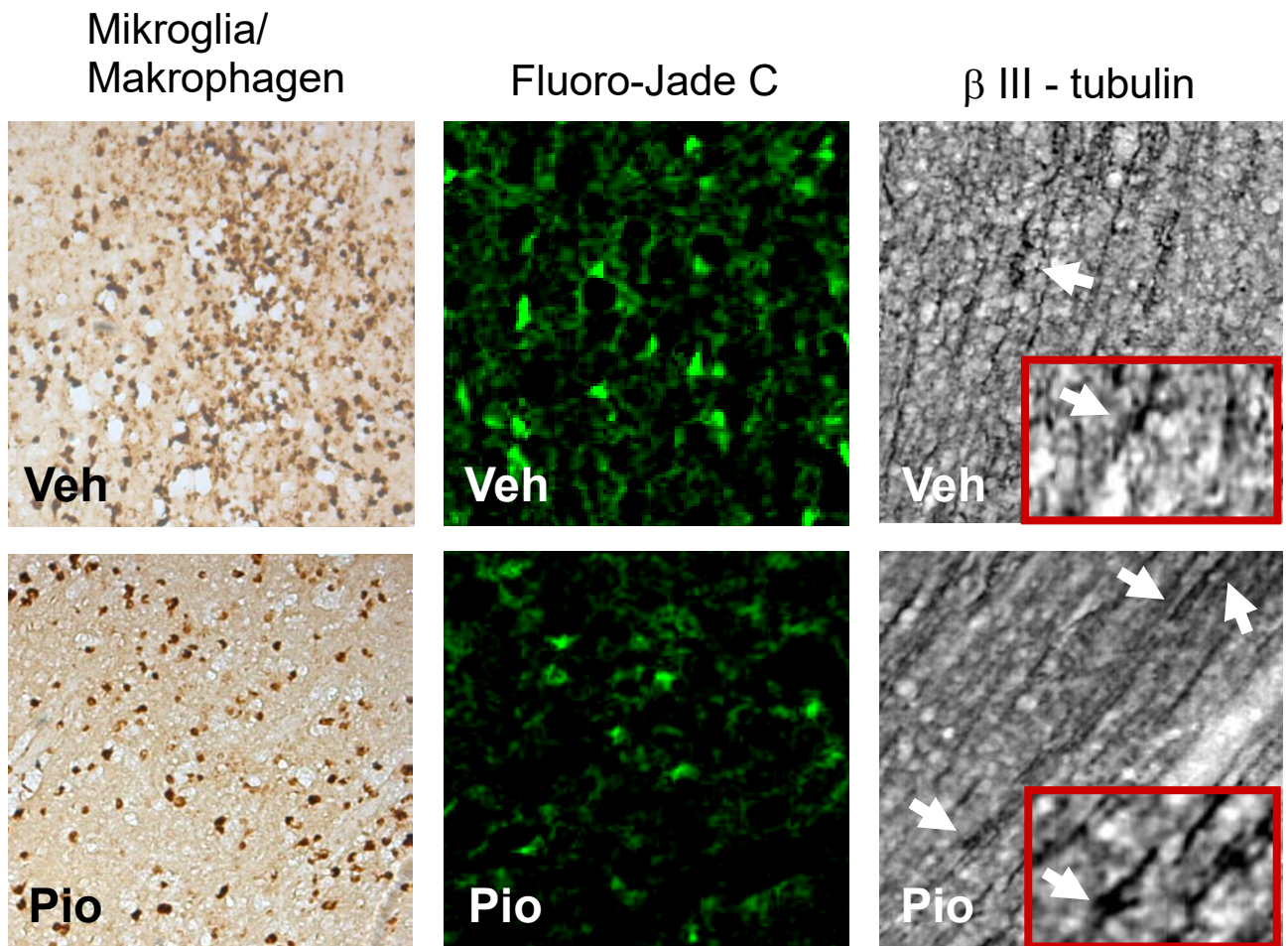
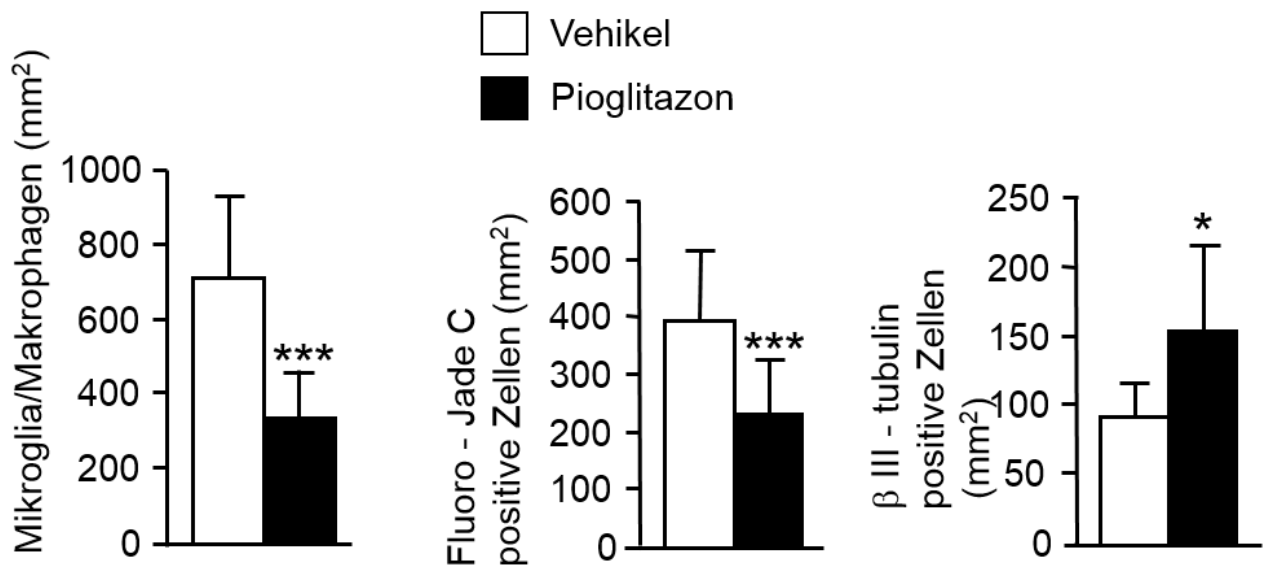


Abbildung 9: Die linken Bilder zeigen die aktivierten Mikroglia/Makrophagen im peri-Infarktgewebe. Es zeigte sich eine reduzierte Infiltration aktivierter Mikroglia/Makrophagen nach Behandlung mit Pioglitazon (unten) im Vergleich zu Vehikel (oben). In den mittleren Bildern wurden die degenerierten Neurone (Immunfluoreszenz-Färbung mit Fluoro-Jade C) dargestellt. Diese leuchten grün auf. Nach der Behandlung mit Pioglitazon sind deutlich weniger degenerierte Neurone sichtbar (unten) als nach Vehikel-behandlung (oben). In den Abbildungen rechts ist durch eine immunhistochemische Färbung der β III-Tubulin-exprimierenden Zellen die typische Morphologie der Neurone und der neuronalen Zellfortsätze dargestellt (weiße Pfeile). Es zeigen sich mehr β III-Tubulin-exprimierende Zellen nach Behandlung mit Pioglitazon (unten) als nach Behandlung mit Vehikel (oben).

Abbildung 10



*Abbildung 10: Effekte der post-ischämischen Behandlung mit Vehikel (weiße Säulen) und mit Pioglitazon (schwarze Säulen) auf die Akkumulation von Mikroglia/Makrophagen, die neuronale Degeneration und neuronale Regeneration im ischämischen Kortex. *P<0,05, ***P<0,001, statistische Vergleiche mit der Vehikel-behandelten Gruppe (Student's t-test für ungepaarte Proben).*

4. Diskussion

Die allgemeinen Empfehlungen für die Schlaganfall-Behandlung, inklusive Basistherapie und frühe Sekundärprophylaxe, wurden klar festgelegt (Leitlinien: Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls 2012). Ein wichtiger Bestandteil der postischämischen Therapie stellt die Neuroprotektion dar, als Versuch, die beschädigten und lebensfähigen Nervenzellen durch pharmakologische Eingriffe vor dem Absterben zu bewahren. Wie schon in der Einleitung beschrieben, wurden zu diesem Zweck über 1000 Substanzen als Neuroprotektiva in verschiedenen Tiermodellen des Schlaganfalls getestet, davon mehr als 150 erfolgreich. Obwohl es in klinischen Studien über 110 Substanzen waren, wurde ein Nutzen von medikamentöser Neuroprotektion beim ischämischen Schlaganfall bislang nicht gezeigt. Zum Beispiel waren nach mehreren präklinischen Studien, in denen die neuroprotektiven Effekte von Erythropoetin nach einem ischämischen Schlaganfall nachgewiesen wurden, und anfänglicher Euphorie, die Ergebnisse der klinischen Studien sehr enttäuschend (Ehrenreich et al. 2002, Ehrenreich et al. 2009). In zahlreichen tierexperimentellen Untersuchungen wurden neuroprotektive Auswirkungen einer Angiotensin AT1-Rezeptor-Blockade bei zerebraler Ischämie eindeutig nachgewiesen. Zwei klinische Studien mit Candesartan lieferten leider nur negative Ergebnisse (Schrader et al. 2003, Sandset et al. 2011). Fazit: Leider konnte bis zum heutigen Tage für kein medikamentöses Neuroprotektivum ein günstiger Effekt auf den postischämischen Verlauf nachgewiesen werden (Leitlinien: Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls 2012). Die Gründe, weshalb eine erfolgreiche Übertragung der Ergebnisse von den Tierversuchen in die Klinik scheiterte, sind vielfältig und im Allgemeinen bekannt. Zu den wichtigsten Gründen zählen das fehlerhafte Design der Experimente, die mangelhafte Randomisierung und Verblindung, die fehlende neuronale Untersuchungen oder Bestimmung verschiedener, z.B. physiologischen Parameter und fehlerhafte, ungeeignete statistische Auswertung der Daten (Dirnagl 2006, Macleod et al. 2009). Deshalb wurden im Jahre 2009 die Empfehlungen zur Durchführung von präklinischen Studien klar definiert und festgelegt (Fisher et al. 2009, Liu et al. 2009a). Trotzdem wurden diese Leitlinien in den meisten nachfolgenden Publikationen nicht eingehalten, was zur Folge hatte, dass die meisten veröffentlichten Ergebnisse nicht in den klinischen Alltag umgesetzt werden können.

Die vorliegende randomisierte, verblindete, tierexperimentelle Studie richtet sich in den wichtigen Punkten nach den Leitlinien zur Durchführung der präklinischen Untersuchungen zur Neuroprotektion beim ischämischen Schlaganfall (Liu et al. 2009a). Wir haben zeigen können, dass eine wiederholte, niedrig dosierte, systemische Behandlung mit Pioglitazon, in

der Reperfusionphase eines Schlaganfalls, das Infarktvolumen vermindert, das neurologische Outcome verbessert, die Ischämie-bedingten Entzündungsreaktion und die Neurodegeneration hemmt und die Neuroregeneration fördert. Pioglitazon bewirkte diese Effekte nicht über eine verbesserte Durchblutung des Versorgungsgebiets der ACM während der Ischämie, da sich die ermittelten CBF-Werte in den mit Vehikel- und Pioglitazon behandelten Gruppen nicht unterscheiden.

Pioglitazon vermindert die Insulinresistenz und verändert den Glukosemetabolismus im Sinne einer antidiabetischen Stoffwechsellage. Jede Entgleisung des Glukosestoffwechsels nach einem ischämischen Schlaganfall spiegelt sich ungünstig für den Ausgang und die Prognose wieder. Deshalb haben wir in beiden Vorversuchen die Effekte einer wiederholten Behandlung mit verschiedenen Dosen von Pioglitazon untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Glukosekonzentration im Blut bei den mit Pioglitazon- und Vehikel-behandelten Ratten zu jedem Zeitpunkt nach der Behandlung identisch waren.

Zahlreiche Studien am Tiermodell haben bereits gezeigt, dass eine Behandlung mit TZDs vor und während einer zerebralen Ischämie positive Auswirkungen auf den Ausgang nach einem ischämischen Schlaganfall hat (White und Murphy 2010). Bei der Behandlung nach ischämischem Infarkt hat es jedoch bisher eher widersprüchliche Ergebnisse gegeben. Während Gamboa et al. (2010) keine positiven Effekte durch die postischämische Anwendung von TZDs nachweisen konnten, demonstrierten Ji et al. (2009) und Tureyen et al. (2007) das Gegenteil. Unsere Untersuchungen zeigen eindeutig, dass eine postischämische Behandlung mit einer niedrigen Dosis von Pioglitazon das Schlaganfallvolumen vermindert. Da es unter Pioglitazon-behandlung am 2. und am 5. Tag zu einer ähnlichen Infarktvolumenreduktion nach MCAO kam (-31% am 2. und -29% am 5. Tag), kann davon ausgegangen werden, dass der Effekt von Pioglitazon bereits 48 Stunden nach MCAO auftritt. Die anatomische Läsion im Gehirn ist schon 24 - 48 Stunden nach Ischämie voll ausgeprägt, jedoch kann wohl eine weitere Ausbreitung der strukturellen Schädigung durch die Rekrutierung von Anteilen der Penumbra zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden (Boysen und Christensen 2001; Dirnagl et al. 1999).

Die Entzündungsreaktion, die frühzeitig nach einem ischämischen Infarkt entsteht, ist, neben dem primären Zelltod durch Sauerstoffmangel, die Hauptursache für den Untergang von geschädigten Neuronen nach einem Schlaganfall. Somit spielt die postischämische Inflammation bei der Ausbreitung der ischämischen Läsion nach einem Schlaganfall eine entscheidende Rolle. Kurz nach einem zerebralen Insult kommt es zu einer ausgeprägten

metabolischen und inflammatorischen Reaktion (Boysen und Christensen, 2001). Pro-inflammatorische Gene werden aktiviert und setzen inflammatorischen Mediatoren, wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und TNF- α , frei. Diese Mediatoren führen zur Bildung reaktiver Mikroglia und fördern damit das vermehrte Einwandern von Granulozyten und Makrophagen in ischämische Hirnareale (Dirnagl et al. 1999, Heneka und Landreth 2007). Wir haben zeigen können, dass Pioglitazon die Akkumulation von aktivierten Mikroglia/Makrophagen im Randgebiet des ischämischen Gewebes, sowohl in der akuten als auch in der späten Phase nach zerebraler Ischämie, reduziert. Dies könnte durch die Unterdrückung der Transkription von pro-inflammatorischen Genen verursacht sein (Ricote und Glass 2007). Nach einer Behandlung mit Pioglitazon können bereits 24 Stunden nach einem ischämischen Infarkt niedrigere Spiegel von z.B. IL-1 β nachgewiesen werden (Glatz et al. 2010). Wenn TZDs vor, während oder direkt nach einem ischämischen Insult verabreicht werden, werden zahlreiche neuroprotektive Mechanismen aktiviert, wie zum Beispiel die gesteigerte Expression von PPAR- γ und die Hemmung einer übermassigen Expression von TNF- α und COX-2 in Ischämie-geschädigten Neuronen (Culman et al. 2007; Victor et al. 2006, Zhao et al. 2006a). Interessanterweise konnte eine reduzierte Expression von TNF- α und COX-2 in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise lässt sich dieses Ergebnis durch den zeitlichen Ablauf der Entzündungsreaktion nach ischämischem Infarkt erklären. TZDs verabreicht vor- und während des ischämischen Anfalls können durch eine erhöhte Induktion von PPAR- γ die COX-2- und TNF- α Expression in beschädigten Neuronen schon in der frühen Phase nach dem Insult effektiv unterdrücken (Zhao et al. 2006). Schon wenige Stunden nach dem Beginn der zerebralen Ischämie ist der Spiegel der COX-2- und des TNF- α in der Penumbra sehr hoch. Deshalb kann Pioglitazon, wenn in der Reperfusionphase appliziert, deren Expression nicht mehr beeinflussen. Im Gegensatz zu unseren Daten berichten Tureyen et al. (2007) über eine effektive Reduktion von COX-2 im Infarktareal bei normotensiven und hypertensiven Ratten nach einmaliger Gabe von Rosiglitazon 2 Stunden nach dem Beginn der Reperfusion. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine kurzzeitige Aktivierung von PPAR- γ durch Rosiglitazon eine bessere Inhibition der COX-2-Expression und der damit verbundenen Entzündungsreaktion induziert, als eine gleichmäßige lang-andauernde Aktivierung des Rezeptors. Diese Annahme widerspricht jedoch den Ergebnissen unserer Studie, in der eine langfristige Aktivierung von PPAR- γ durch die kontinuierliche Applikation von Pioglitazon intrazerebroventrikulär zu einer effektiven Reduktion der COX-2 und TNF- α Expression, sowie der Anzahl an COX-2-positiven Zellen im Peri-infarkt Areal führt (Zhao et al. 2006a). Eine definitive Aussage über die Folgen einer kurz- bzw. langfristigen Aktivierung von

PPAR- γ auf die Expression von COX-2 und TNF- α ist somit zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht möglich. Die Apoptose und der neuronale Tod korreliert mit der Ausprägung der inflammatorischen Reaktionen, z.B. mit dem Grad der COX-2 Expression in den beschädigten Neuronen (Zhao et al. 2006a). Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass die Behandlung mit Pioglitazon in der Reperfusionphase die Apoptose-Marker und damit die Apoptoserate in dem Randgebiet des nekrotischen Gewebes nicht beeinflusste.

Wie schon erwähnt, kann die Behandlung mit einem PPAR- γ -Agonisten nach Hirninfarkt eine effektive Suppression der Entzündungsreaktion und eine verminderte Ausbreitung der Schädigung bewirken. Die Neuronen der Penumbra können Stunden bis Tage nach Infarkt erhalten bleiben. Dies konnte anhand von postischämisch durchgeführten PETs demonstriert werden (Dirnagl et al. 1999). Unsere Daten zeigen, zum ersten, dass eine frühzeitige und kurzandauernde Behandlung mit Pioglitazon nach dem Beginn der Reperfusion die Voraussetzung für die Verminderung der Infarktgröße darstellt, und zum zweiten, dass eine langandauernde Behandlung mit dem PPAR- γ Agonist keinen zusätzlichen Vorteil in Bezug auf die Größe des Hirninfarkts bietet. Auf der anderen Seite, hemmt die verzögerte und langandauernde Applikation von Pioglitazon die Akkumulation von aktivierten Mikroglia/Makrophagen im ischämischen Gewebe, und schützt somit die Neuronen vor weiteren oxidativen Schäden, sodass ein besseres funktionelles Outcome und eine bessere Erholung nach einem Schlaganfall erreicht werden können.

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Studie ist der Nachweis, dass Pioglitazon die Neurodegeneration nach einem Hirninfarkt vermindert und die Neuroregeneration unterstützt. Nach Ischämie kann es noch nach Stunden und Tagen zum Voranschreiten der neuronalen Schäden kommen. Durch eine mitochondriale Funktionsstörung und der damit verbundenen verminderten zellulären Energieproduktion sowie der Störung des axonalen Transports kommt es zu einer späten neuronalen Degeneration (Mazzeo et al. 2009). Pioglitazon vermag diese schädigenden Vorgänge zu hemmen und führt zu einer wesentlichen Reduktion der Zahl der degenerierten Neuronen im ischämischen Gewebe. Zuhayra et al. (2011) berichten, dass Pioglitazon-behandelte Ratten nach einem ischämischen Infarkt eine verringerte anterograde transneuronalen Degeneration in der Substantia nigra aufwiesen. Die Aktivierung von PPAR- γ schützt die Mitochondrien und stabilisiert den zellulären Energiestoffwechsel (Fuenzalida et al. 2007). Folglich vermindert eine Aktivierung des Rezeptors durch Pioglitazon die neuronale Degeneration, die auf die Induktion von ROS-neutralisierenden Enzymen, Herabregulation der ROS-bildenden Enzyme und Schutz von Neuronen vor exzitatorischen

Vorgängen zurückzuführen ist (Shimazu et al. 2005; Zhao et al, 2006b; Zuhayra et al. 2011).

Wir haben beobachtet, dass Pioglitazon das Wachstum von Neuriten im ischämischen Gewebe fördert. Dies konnte anhand der Färbung von β III-Tubulin im ischämischen Kern und den Peri-Infarkt Arealen deutlich nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind im Einklang mit unseren publizierten Daten die eindeutig zeigen, dass Pioglitazon die Expression von β III –Tubulin in Neuronen und Dendriten fördert und Neurone dadurch vor oxidativem Stress schützt (Zuhayra et al. 2011).

Die neuroprotektiven Effekte von Pioglitazon spiegeln sich in dem verbesserten neurologischen Status nach dem ischämischen Schlaganfall. White und Murphy (2010) zeigten, dass, unabhängig vom Zeitpunkt der ersten Behandlung, die Anwendung von Glitazonen zu einem besseren Outcome nach Schlaganfall führen. Wir berichten in der vorliegenden Studie, dass die mit Pioglitazon behandelten Tiere in der post-ischämischen Reperusionsphase geringere neurologische Ausfälle als die mit Vehikel behandelten Tiere aufweisen. Dies zeigte sich besonders bei der Hemiparese der vorderen Extremität und den sensorischen Störungen. Insgesamt litten mehr Vehikel-behandelte Tiere an ausgeprägten sensorischen und motorischen Defizite als Pioglitazon-behandelte Tiere. Im 2-Tages Protokoll tragen hauptsächlich die schlechten neurologischen Ergebnisse bei den Vehikel-behandelten Ratten am 2. Tag nach MCAO zu den signifikanten Unterschieden bei dem neurologischen Status bei (Protokoll 1). Die Versuchstiere, die besonders ausgeprägte neurologische Defizite aufwiesen, sind oft zwischen dem 2. und 3. Tag nach MCAO verstorben, sodass diese vom 5-Tages Experiment (Protokoll 2) ausgeschlossen werden mussten. Dies bedeutet, dass nur die mit Vehikel-behandelten Ratten, die weniger ausgeprägte Folgen des Schlaganfalls hatten, in dem 5-Tages Protokoll am Ende des Experiments neurologisch bewertet werden konnten. Folglich wurden in dieser Versuchsreihe keine Unterschiede in dem neurologischen Status zwischen den Vehikel- und Pioglitazon -behandelten Ratten in den ersten 2 Tagen nach MCAO beobachtet. Allerdings, wurde bei den mit Pioglitazon-behandelten Tieren ein milderer Grad der Hemiparese der vorderen Extremität, sowie der Ausfälle von Tasthaar-Sensibilität am 4. und 5. Tag, also in der späten Phase nach Ischämie, festgestellt. Dies wird in der Fachliteratur als ein wichtiger Parameter für die Einschätzung von Spätfolgen behandelt. Somit weisen die tierexperimentellen Daten darauf hin, dass Pioglitazon eine deutliche Besserung der motorischen Einschränkungen bewirken kann.

Die verminderte zerebrale Perfusion während eines ischämischen Schlaganfall führt zu weiteren neuronalen Schäden der betroffenen Hirnareale (Ntaios et al. 2010). Studien haben

gezeigt, dass Pioglitazon in hypertensiven Ratten eine blutdrucksenkende Wirkung durch direkte vaskuläre Einflüsse hat (Buchanan et al., 1995; Schiffrin et al., 2003). Da die Perfusion des Hirngewebes nach einem Infarkt durch den Ausfall der zentralen Regulierung des Gehirnblutflusses von dem systemischen Blutdruck abhängt, war es in unserem Versuchsprotokoll notwendig, die kardiovaskulären Parameter, den Blutdruck und die Herzfrequenz, zu bestimmen. Gemäß den Leitlinien für die Durchführung der präklinischen Studien an experimentellen Tieren wurden die kardiovaskulären Parameter vor- während und nach dem Schlaganfall aufgezeichnet. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die mit Pioglitazon-behandelten Tiere in der Reperfusionphase, im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren, keine Unterschiede im Blutdruck, der Herzfrequenz und den physiologischen Blutparametern aufwiesen. Pioglitazon greift in den Metabolismus der Glukose ein. Eine Hyper- oder Hypoglykämie kann den Infarkt vergrößern und ist ungünstig für den weiteren Prognoseverlauf. Es ist deshalb sehr wichtig, dass wir zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied in den Glukose- und Laktatwerten zwischen den mit Pioglitazon- und Vehikel-behandelten Ratten gefunden haben.

Interessanterweise hatte die höhere Dose von Pioglitazon keine günstigen Effekte auf das Infarkt volumen und den neurologischen Status nach der zerebralen Ischämie. Ein Verlust der neuroprotektiven Wirkung von hohen Dosen von Pioglitazon wurde auch von Gamboa et al. (2010) publiziert. Obwohl die Penetration von Pioglitazon in das Gehirngewebe sehr niedrig ist, kann sich die Diffusion des PPAR- γ Agonisten ins Gehirn aufgrund der fehlenden Blut-Hirn-Schranke-Integrität deutlich erhöhen (Maeshiba et al. 1997, Rosenberg 2012).

Pioglitazon stimuliert in der üblichen therapeutischen Dosierung die Laktatproduktion in Astrozyten und erhöht die Oxidation von Laktat in Neuronen, ohne Anstieg von reaktiven ROS (Dello Russo et al. 2003). Dagegen bewirkt eine 5 – 10-fach erhöhte Konzentration von Pioglitazon im Blut eine verstärkte Bildung von ROS in Neuronen und führt somit zu neuronalen Schäden und neuronalem Zelltod über einen PPAR- γ -unabhängigen Mechanismus (Izawa et al. 2009). Systemisch verabreicht penetriert Pioglitazon, unter physiologischen Bedingungen, nur geringfügig ins Hirngewebe. Es ist anzunehmen, dass der Integritätsverlust der Blut-Hirn-Schranke nach einem ischämischen Schlaganfall zu einer gesteigerten Penetration von Pioglitazon ins Hirngewebe führt, wodurch sich die Konzentration des Wirkstoffes im neuronalen Gewebe deutlich erhöht (Maeshiba et al. 1997; Rosenberg 2012). Die hohe Dosis von Pioglitazon in *sham*-operierten Tieren, die über eine intakte Blut-Hirn-Schranke verfügen, hatte erwartungsgemäß keine Auswirkungen auf den neurologischen

Status. Der Verlust der neuroprotektiven Eigenschaften von hohen Dosen von Pioglitazon lässt sich durch die erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke nach dem ischämischen Insult gut erklären.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Effekte einer systemischen (subkutanen) Behandlung von Ratten mit Pioglitazon nach ischämischem Schlaganfall untersucht. Wir berichten, dass eine chronische systemische Behandlung von Ratten mit Pioglitazon auf 2 oder 5 aufeinander folgenden Tagen das Infarktvolume reduziert und motorische und sensorische Ausfälle mildert. Darüber hinaus hemmt Pioglitazon die Akkumulation von inflammatorischen Zellen (Mikroglia/Makrophagen) im Randgebiet des ischämischen Kerns im frontoparietalen Cortex, reduziert die neuronale Degeneration und fördert die neuronale Regeneration. Diese Effekte können entscheidend dazu beitragen, die kortikale Dysfunktion zu mildern, die kognitiven Leistungen und langfristig auch den Ausgang nach einem ischämischen Schlaganfall zu verbessern. Trotz der Tatsache, dass keine Langzeituntersuchungen zu der Auswirkung der chronischen systemischen Behandlung mit Pioglitazon nach einer zerebralen Ischämie durchgeführt wurden, ist diese Studie bis zum heutigen Tage die umfangreichste und einzige, die den Anforderungen den Leitlinien für die präklinischen Schlaganfallstudien an Nagetieren (Liu et al. 2009a) entspricht.

In klinischen Studien reduzierte Pioglitazon die Gesamtmortalität, Herzinfarkt- und Schlaganfall Inzidenz bei diabetischen Patienten mit schweren kardiovaskulären Begleiterkrankungen (Dormandy et al. 2005). In einer retrospektiven Studie, die leider nur ein kleines Kollektiv von Schlaganfallpatienten mit dem Typ-2 –Diabetes umfasst, wurde berichtet, dass die Behandlung mit TZDs zwar den funktionellen Score nach dem Schlaganfall verbesserte, die Länge der Rehabilitation im Krankenhaus nicht beeinflusste (Lee und Reding 2007). Eine Analyse von randomisierten, kontrollierten klinischen Studien berichtet, dass eine Therapie von Patienten, die einen Schlaganfall oder eine TIA erlitten haben, mit PPAR- γ -Agonisten die Inzidenz von wiederholten Schlaganfällen oder schweren kardiovaskulären Komplikationen vermindert (Liu und Wang, 2015). Die Analyse von präklinischen Studien über die TZDs und ihrer neuroprotektiven Wirkung nach einem ischämischen Schlaganfall hat deutlich gezeigt, dass die Behandlung mit TZDs das Schlaganfallvolumen reduziert und den neurologischen Status verbessert (White und Murphy, 2010). Diese Berichte, zusammen mit der vorliegenden Studie, bilden einen ausreichenden Rahmen für die Planung und Durchführung von klinischen Studien, die die Auswirkung von Pioglitazon bei Schlaganfallpatienten untersuchen würden.

Die verheerendsten Schäden nach einem Schlaganfall treten innerhalb einiger Stunden bis

Tage auf. Durch eine Behandlung mit Pioglitazon in dieser Zeitspanne ist auf Grund der vorliegenden Studien die Annahme gerechtfertigt, dass es zu einem verbesserten Outcome ohne ausgeprägte Nebenwirkungen kommen könnte. Im Gegensatz zu den bisher erforschten Pharmaka, die eine Neuroprotektion erhoffen ließen, und Nebenwirkungen wie Müdigkeit oder Bewusstseinsstörungen verzeichnen (Röther 2008), ist Pioglitazon in der Kurzzeitbehandlung der akuten Phase nach Ischämie nebenwirkungsarm. Unerwünschte Nebenwirkungen, wie zum Beispiel eine erhöhte Inzidenz an Herzinsuffizienz und Herzversagen, Ödembildung und Gewichtszunahme, treten erst bei einer Langzeitbehandlung auf. Die zur Therapie von Typ 2 Diabetes übliche Dosierung sollte, so bald wie möglich, nach Schlaganfall angewendet werden, während eine höhere Dosierung vermieden werden sollte. Wang et al. (2009) zeigten, dass Rosiglitazon die neuroprotektive Wirkung von rtPA verstärkt und das Zeitfenster für eine rtPA-Anwendung verlängert. Auch bei hämorrhagischen zerebralen Insulten bei Ratten hat sich Pioglitazon als neuroprotektiv gezeigt (Zhao et al. 2007), sodass eine frühzeitige Therapie sehr wahrscheinlich auch ohne die vorherige Durchführung einer CT- oder MRT-Untersuchung begonnen werden könnte (Gamboa et al. 2010). Dabei ist es vorteilhaft, dass die Pharmakokinetik und die Nebenwirkungen von Pioglitazon in der Klinik bekannt sind. Aufgrund des nachgewiesenen geringen Nebenwirkungsprofils in der Kurzzeitbehandlung, könnte sich Pioglitazon als wertvolle Alternative bzw. ergänzendes Therapeutikum zur Thrombolyse, vor allem in der sogenannten Prähospitalphase (definiert als das Intervall zwischen Schlaganfallbeginn und Krankenhausaufnahme) (Kessler et al. 2011) anbieten. Hier eröffnen sich nun weitere vielversprechende Möglichkeiten zur effektiven Behandlung des Schlaganfalls und interessante Forschungsansätze für die Zukunft.

Literaturverzeichnis

Deutsche Gesellschaft für Neurologie: Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls, Aktualisierung der Leitlinie im September 2012: <http://www.dgn.org/leitlinien/2310-II-22-2012-akuttherapie-des-ischamischen-schlaganfalls>

Adams HP, del Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Furlan A, Grubb RL, Higashida RT, Jauch EC, Kidwell C, Lyden PD, Morgenstern LB, Qureshi AI, Rosenwasser RH, Scott PA, Wijidicks EF (2007): *Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke*. Stroke 38: p165-1711

Allahtavakoli M, Moloudi R, Arabadi MK, Shamsiyade A, Javanmardi K (2009): *Delayed post ischemic treatment with Rosiglitazone attenuates infarct volume, neurological deficits and neutrophilia after embolic stroke in rat*. Brain Research 1271: p121-127

Auriel E, Bornstein NM (2010): *Neuroprotection in acute ischemic stroke – current status*; Journal of Cellular and Molecular Medicine Vol 14 No 9: p2200-2202

Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986): *Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination*. Stroke 17: p472-476

Boysen G, Christensen H (2001): *Early Stroke: A Dynamic Process*. Stroke 32, p2423-2425

Bordet R, Ouk T, Petrault O, Gelé P, Gautier S, Laprais M, Deplanque D, Duriez P, Staels B, Fruchart JC, Bastide M (2006): *PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases*. Biochemical Society Transactions Pt 6: p1341-1346

Brdon J, Kaiser S, Hagemann F, Zhao Y, Culman J, Gohlke P (2007): *Comparison between early and delayed systemic treatment with candesartan of rats after ischaemic stroke*. Journal of Hypertension 1: p187-196

Buchanan TA, Meehan WP, Jeng YY, Yang D, Chan TM, Nadler JL, Scott S, Rude RK, Hsueh WA (1995): *Blood pressure lowering by pioglitazone. Evidence for a direct vascular effect.* Journal of Clinical Investigation 96: p354-360

Culman J, Nguyen-Ngoc M*, Glatz T, Gohlke P, Herdegen T, Zhao Y (2012): *Treatment of rats with pioglitazone in the reperfusion phase of focal cerebral ischemia: a preclinical stroke trial.* Experimental Neurology 238: p243-253 *geteilte Erstauteurschaft

Culman J, Zhao Y, Gohlke P, Herdegen T (2007): *PPAR- γ : therapeutic target for ischemic stroke.* TRENDS in Pharmacological Sciences Vol 28, 5: p244-248

Dello Russo C, Gavriilyuk V, Weinberg G, Almeida A, Bolanos JP, Palmer J, Pelligrino D, Galea E, einstein DL (2003): *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma thiazolidinedione agonists increase glucose metabolism in astrocytes.* Journal of Biological Chemistry 278: p5828-5836

Desvergne B, Wahli W (1999): *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism.* Endocrine Reviews 20: p649-688

Diederichs C, Mühlenbruch K, Lincke HO, Heuschmann PU, Ritter MA, Berger K (2011): *Prädiktoren für eine spätere Pflegebedürftigkeit nach einem Schlaganfall.* Deutsches Ärzteblatt 36: p592-599

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999): *Pathobiology of Ischaemic Stroke: An Integrated View.* Trends in Neuroscience 22: p391-397

Dirnagl U (2006): *Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research.* Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 26 (12): p1465-1478

Dirnagl U, Fisher M (2012): *International, Multicenter Randomized Preclinical Trials in Translational Stroke Research: It is Time to Act.* Stroke 44: p1453-1454

Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefèbvre PJ, Murrasz GD, Standl E, Wilcox RG, Wilhelmsen L, Betteridge J, Birkeland K, Golay A, Heine RJ, Korányi L, Laakso M, Mokán M, Norkus A, Pirags V, Podar T, Scheen A, Scherbaum W, Schernthaner G, Schmitz O, Skrha J, Smith U, Taton J (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: p1279-1289

Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rütther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL (2002): *Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial.* Molecular Medicine 8 (8): p495-505.

Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegrzyn M, Jähnig P, Herrmann M, Knauth M, Bähr M, Heide W, Wagner A, Schwab S, Reichmann H, Schwendemann G, Dengler R, Kastrup A, Bartels C (2009): *Recombinant Human Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke.* Stroke 40: p e647-e656

Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH (2009): *Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations.* Stroke: p2244-2250

Fuenzalida K, Quintanilla R, Ramos P, Piderit D, Fuentealba RA, Martinez G, Inestrosa NC, Bronfman M (2007): *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis.* Journal of Biological Chemistry 282: p37006-37015

Gamboa J, Blankenship DA, Niemi JP, Landreth GE, Karl M, Hilow E, Sundararajan S (2010): *Extension of the neuroprotective time window for thiazolidinediones in ischemic stroke is dependent on time of reperfusion.* Neuroscience 170: p846-857

- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ (1995): *Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation.* Stroke 26: p627-634 (discussion 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 β/δ and the regulation of interleukin 1 receptor antagonist expression by pioglitazone in the ischaemic brain.* Journal of Hypertension 28: p1488-1497
- Green AR, Shuaib A (2006): *Therapeutic strategies for the treatment of stroke.* Drug Discovery Today Vol 11, 15/16: p681-693
- Groth W, Blume A, Gohlke P, Unger T, Culman J (2003): *Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats.* Journal of Hypertension 21: p2175-2182
- Guo J, Walss-Bass C, Luduena RF (2010): *The β Isotypes of Tubulin in Neuronal Differentiation.* Cytoskeleton 67: p431-441
- Heiss W-D (1997): *Pathophysiologie des ischämischen Insults.* klinikarzt 11/26, p288-292
- Heneka MT, Landreth GE (2007): *PPARs in the brain.* Biochimica et Biophysica Acta 1771: p1031-1045
- Horn J, Limburg M (2001): *Calcium antagonists for ischemic stroke: a systematic review.* Stroke 32(2): p 570-576
- Horn J, de Haan RJ, Vermeulen M, Luiten PG, Limburg M (2001): *Nimodipine in animal model experiments of focal cerebral ischemia: a systematic review.* Stroke 32(10): p 2433-2438

- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ (2006): *Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia*. Surgical Neurology 66: p232-245
- Iadecola C, Alexander M (2001): *Cerebral ischemia and inflammation*. Current Opinion in Neurology 14: p89-94
- Izawa Y, Takahashi S, Suzuki N (2009): *Pioglitazone enhances pyruvate and lactate oxidation in cultured neurons but not in cultured astroglia*. Brain Research 1305: p64-73
- Ji S, Kronenberg G, Balkaya M, Färber K, Gertz K, Kettenmann H, Endres M (2009): *Acute neuroprotection by pioglitazone after mild brain ischemia without effect on long-term outcome*. Experimental Neurology 216: p321-328
- Kessler C, Khaw AV, Nabavi DG, Glahn J, Grond M, Busse O (2011): *Standardisiertes Vorgehen in der Prähospitalphase des Schlaganfalls*. Deutsches Ärzteblatt 36: p585-591
- Koziol JA, Feng AC (2006): *On the Analysis and Interpretation of Outcome Measures in Stroke Clinical Trials: Lessons from the SAINT I Study of NXY-059 for Acute Ischemic Stroke*. Stroke 37: p 2644-2647
- Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundörfer B, Schöffski O, Krobot KJ (2006): *Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project*. Stroke 37: 1179-83.
- Lapchak PA (2010): *Erythropoietin molecules to treat acute ischemic stroke: a translational dilemma!* Expert Opinion Investigational Drugs 10: p1179-1186
- Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW (2000): *Brain tissue responses to ischemia*. The Journal of Clinical Investigation Vol 106, 6: p723-731
- Lee J, Reding M (2006): *Effects of thiazolidinediones on stroke recovery: a case-matched controlled study*. Neurochemical Research 32: p481-487
- Lees KR, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Grotta J, Lyden P, Shuaib A, Ashwood T, Hardemark HG, Wasiewski W, Emeribe U, Zivin JA (2006): *Additional Outcomes and Subgroup Analyses of NXY-059 for Acute Ischemic Stroke in the SAINT I Trial*. Stroke 37: p2970-2978

- Lin TN, Cheung WM, Wu JS, Chen JJ, Lin H, Liou JY, Shyue SK, Wu KK (2006): *15d-prostaglandin J₂ protects brain from ischemia-reperfusion injury*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26: p481-487
- Liu F, Schafer DP, McCullough LD (2009b): *TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion*. *Journal of Neuroscience Methods* 179: p1-8
- Liu J, Wang LN (2015): *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists for preventing recurrent stroke and other vascular events in patients with stroke or transient ischaemic attack*. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 10: p CD010693
- Liu S, Zhen G, Meloni BP, Campbell K, Winn HR (2009a): *Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1st Edition)* *Journal of Experimental Stroke and Translational Medicine* 2: p2-27
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM (2006): *The role of inflammation in CNS injury and disease*. *British Journal of Pharmacology* 147: p232-240
- Luo Y, Yin W, Signore AP, Zhang F, Hong Z, Wang S, Graham SH, Chen J (2006): *Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone*. *Journal of Neurochemistry* 97: p435-448
- Macleod MR, van der Worp HB, Sena ES, Howells DW, Dirnagl U, Donnan GA (2008): *Evidence for the efficacy of NXY-059 in experimental focal cerebral ischaemia is confounded by study quality*. *Stroke* 39: p2824-2829
- Macleod MR, Fisher M, O'Collins V, Sena ES, Dirnagl U, Bath PMW, Buchan A, van der Worp HB, Traystman R, Minematsu K, Donnan GA, Howells DW (2009): *Good Laboratory Practice: Preventing Introduction of Bias at the Bench*. *Stroke* 40: p e50-e52
- 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: p29-35
- Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF (2000): *Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke*. *Cell Tissue Research* 301: p173-187

- Mazzeo AT, Beat A, Singh A, Bullock MR (2009): *The role of mitochondrial transition pore, and its modulation, in traumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI*. *Experimental Neurology* 218: p363-370
- Millán M, Dávalos A (2006): *The Need for New Therapies for Acute Ischaemic Stroke*. *Cerebrovascular Diseases* 22(suppl1): p3-9
- Ntaios G, Bath P, Mihel P (2010): *Blood pressure treatment in acute ischemic stroke: a review of studies and recommendations*. *Current Opinions in Neurology* 23: p46-52
- Ou Z, Zhao S, Labiche LA, Strong R, Grotta JC, Hermann O, Aronowski J (2006): *Neuronal expression of peroxisome proliferator-activated receptor- gamma (PPAR γ) and 15d-prostaglandin J₂-mediated protection of brain after experimental cerebral ischemia in rat*. *Brain Research* 1096: p196-203
- Padosch SA, Vogel P, Böttiger BW (2001): *Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie*. *Anaesthesist* 50: p905-920
- Patzer A, Zhao Y, Stöck I, Gohlke P, Herdegen T, Culman 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*. *European Journal of Neuroscience* 28: p1786-1794
- Pereira MP, Hurtado O, Cárdenas A, Alonso-Escolano D, Boscá L, Vivancos J, Nombelo F, Leza JC, Lorenzo P, Lizasoain I, Moro MA (2005): *The Nonthiazolidinedione PPAR γ Agonist L-796, 449 Is Neuroprotective in Experimental Stroke*. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64: p797-805
- Ricote M, Glass CK (2007): *PPARs and molecular mechanisms of transrepression*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1771: p926-935
- Rosenberg GA (2012): *Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier*. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32 (7): p1139-51
- Röther J (2008): *Neuroprotection Does Not Work!* *Stroke* 39, p523-524

- Sandset EC, Bath PM, Boysen G, Jatuzis D, Kõrv J, Lüders S, Murray GD, Richter PS, Roine RO, Terént A, Thijs V, Berge E (2011): *The angiotensin-receptor blocker candesartan for treatment of acute stroke (SCAST): a randomised, placebo-controlled, double-blind trial*. *Lancet* 377: p741-750.
- Savitz SI, Fisher M (2007): *NXY-059 for the treatment of stroke*. *New England Journal of Medicine* 21: p2198-2199
- Schiffirin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M, Diep QN (2003): *Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension*. *Hypertension* 42: p664-668
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L (2005): *Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labelin of degenerating neurons*. *Brain Research* 1035: p24-31
- Schrader J, Lüders S, Kulschewski A, Berger J, Zidek W, Treib J, Einhüpl K, Diener HC, Dominiak P (2003): *The ACCESS Study: Evaluation of Acute Candesartan Cilxetil Therapy in Stroke Survivors*. *Stroke* 34: p1699-1703
- Shimazu T, Inoue I, Araki N, Asano Y, Sawada M, Furuya D, Nagoya H, Greenberg JH (2005): *A peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist reduces infarct size in transient but not in permanent ischemia*. *Stroke* 36: p353-359
- Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U (2007): *NXY-059 for the Treatment of Acute Ischemic Stroke*. *New England Journal of Medicine* 357 (6): p562-571
- Sundararajan S, Gamboa JL, Victor NA, Wanderi EW, Lust WD, Landreth GE (2015): *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia*. *Neuroscience* 130: p685-696
- Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR (1990): *A semi-automated method for measuring brain infarct volume*. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2: p290-293
- Tureyen K, Kapadi R, Bowen KK, Satriotomo I, Liang J, Feinstein DL, Vemuganti R (2007): *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents*. *Journal of Neurochemistry* 101: p41-56

- Victor NA, Wanderi EW, Gamboa J, Zhao X, Aronowski J, Deininger K, Lust WD, Landreth GE, Sundararajan S (2006): *Altered PPARgamma expressin and activation after transient focal isccemia in rats*. European Journal of Neuroscience 24: p1653-1663
- Wang CX, Ding X, Noor R, Pegg C, He C, Shuaib A (2009): *Rosiglitazone alone or in combination with tissue plasminogen activator improves ischemic brain inury in an embolic model in rats*. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 29: p1683-1694
- Wang Q, Tang XT, Yenari MA (2007): *The inflammatory response in stroke*. Journal of Neuroimmunology 184: p53-68
- White AT, Murphy AN (2010): *Administration of thiazolidinediones for neuroprotetion in ischemic stroke: a pre-clinical systematic review*. Journal of Neurochemistry 115: p845-853
- Zhao X, Ou Z, Grotta JC, Waxham N, Aronowski J (2006b): *Peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) activation protects neurons from NMDA excitotoxicity*. Brain Research 1073-1074: p460-469
- Zhao X, Sun G, Zhang J, Strong R, Song W, Gonzalez N, Grotta JC, Aronowski J (2007): *Hematoma resolution as a target for intracerebral hemorrhage treatment: role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in microglia/macrophages*. Annals Neurology 61: p352-362
- Zhao Y, Patzer A, Gohlke P, Herdegen T, Culman J (2005): *The intracerebral applicatio of the PPAR γ -ligand pioglitazone confers neuroprotection against focal ischaemia in the rat brain*. European Journal of Neuroscience: p278-282
- Zhao Y, Patzer A, Herdegen , Gohlke P, Culman J (2006a): *Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats*. The FASEB Journal 20: p1162-1175
- 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*. Neuropathology and Applied Neurobiology 37: p738-752

Lebenslauf

Lan Anh Miriam Nguyen Ngoc lebt in Lörrach in Südbaden mit ihrem Mann, Tobias, und ihren zweijährigen Zwillingen, Emilie und Sophie. Sie ist momentan am Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe als Assistenzärztin am St. Elisabethen Krankenhaus in Lörrach tätig.

- 2002 Abschluss eines International Baccalaureate an der Tintern Girls Grammar School, Melbourne, Australien
- 2003 – 2011 Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- 2012 – 2013 Assistenzärztin am Luisenhospital Aachen, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
- 2014 – jetzt Assistenzärztin am St. Elisabethen Krankenhaus Lörrach, Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Veröffentlichungen

Publikationen:

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

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

* geteilte Erstautorschaft

Zitierbare wissenschaftliche Vorträge:

Zhao Y, Lützen U, **Nguyen-Ngoc M**, Gohlke P, Herdegen T, Culman J (2012): *Pioglitazone reduces neuronal degeneration and promotes neuronal regeneration in the delayed phase of ischaemic stroke*. Journal of Hypertension 30 e (Suppl 1): e107

Nicht zitierbare wissenschaftliche Vorträge:

Zhao Y, **Nguyen-Ngoc M**, Glatz T, Gohlke P, Culman J (2010): *Systemic treatment with pioglitazone early after ischemic stroke confers only moderate neuroprotection*. 3rd International Conference on Hypertension, Lipids, Diabetes & Stroke Prevention. Berlin, Germany.

Nguyen-Ngoc M, Gohlke P, Culman J, Zhao Y (2010): *Systemic treatment with pioglitazone early after ischemic stroke and neuroprotection*. 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. Vancouver, Canada.