

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Karlhans Endlich)
Der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: Die Wirkung von Angiotensin (1-7) Derivaten auf die adulte Neurogenese im
Hippocampus der Ratte nach ischämischem Schlaganfall

Inaugural – Dissertation

Zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

Der Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von:

Tim Binder

geb. am: 02.01.1988

in: Stuttgart – Bad Cannstatt

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver von Bohlen und Halbach

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Bader

(3. Gutachter:)

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Kinderklinik (Raum P01.37)

Tag der Disputation: 26.10.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Einleitung	9
2.1	Schlaganfall	9
	Epidemiologie	9
	Risikofaktoren	9
	Symptome und Einteilung	9
	Pathomechanismen	10
	Therapie	11
2.2	Das periphere Renin-Angiotensin-System	13
	Nomenklatur der Angiotensine	14
	Das zerebrale Renin-Angiotensin-System	14
	Neuroprotektive Effekte des Renin-Angiotensin-Systems	15
	Vorversuch der Firma Pharmaseed Ltd.	16
2.3	Zielsetzung	17
	Hauptfragestellung	17
	Nebenfragestellungen	17
3	Material und Methoden	19
3.1	Studiendesign	19
3.2	Vorversuch durch die Firma Pharmaseed Ltd.	19
3.3	Versuche dieser Arbeit	20
	Gewichts- und Volumenbestimmung der Gehirne	20
	Immunhistochemische Fluoreszenz Färbung der Gehirne	22
3.4	(Mess-)Instrumente und Materialien	30
	Geräte	30
	Chemikalien	31
	Verbrauchsmaterialien	32
	Verwendete Software	33
3.5	Statistische Auswertung	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Volumenmessung	35
4.2	Gewichtsbestimmung	38
4.3	Phosphoryliertes Histon H3	40
4.4	Doublecortin	42
4.5	Caspase 3	44
4.6	Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül-1	46

5	Diskussion	48
5.1	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	48
5.2	Bedeutung der Ergebnisse	49
	Vergleichbarkeit der Gruppen	49
	Phosphoryliertes Histon H3	50
	Doublecortin	51
	Caspase 3	53
	Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül 1 (IBA 1)	55
5.3	Stärken und Schwächen der Arbeit	59
	Gewichts- und Volumenbestimmung	59
	Immunhistologische Methoden	60
	Phosphoryliertes-Histon H3 Färbung	60
	Doublecortin Färbung	61
	Caspase 3 Färbung	62
	Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül 1 Färbung	62
	Stärken und Schwächen des Vorversuches mit Auswirkungen auf die Arbeit	63
	Abschließende Bewertung der Stärken und Schwächen	67
	Ausblick	68
5.4	Schlussfolgerung	69
	Gruppe TXA301	70
	Gruppe TXA302	72
6	Zusammenfassung	73
7	Literaturverzeichnis - zitierte Literatur	74
8	Abbildungsverzeichnis	83
9	Diagrammverzeichnis	84
10	Tabellenverzeichnis	85
11	Anhänge	86

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A.	Arteria
à	zu, je
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym, engl. <i>angiotensin-converting-enzyme</i>
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2, engl. <i>angiotensin-converting-enzyme 2</i>
AIF	Apoptose induzierender Faktor, engl. <i>apoptosis inducing factor</i>
Ang-(1-7)	Angiotensin-(1-7)
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
APAF1	Faktor 1 zur Aktivierung der apoptotischen Protease, engl. <i>apoptotic protease activating factor 1</i>
AT-1R	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
AT-2R	Angiotensin II Typ 2 Rezeptor
BC	Britisch-Kolumbien
BDNF	vom Gehirn stammender neurotropher Faktor, engl. <i>brain derived neurotrophic factor</i>
BSA	bovines Serumalbumin = Rinderserumalbumin
CA	Kalifornien
ca.	circa
CAN	Canada
CH	Confoederatio Helvetica = Schweiz
Cy3	Indocarbocyanin 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCX	Doublecortin

DE	Deutschland
DG	Gyrus dentatus, von engl. <i>dentate gyrus</i>
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
engl.	englisch
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, engl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>
g	Gramm
h	Stunde
H+L	Schwer- und Leicht[ketten] (engl. <i>heavy + light</i>)
IBA1	ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül-1, engl. <i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
IGF	insulinähnlicher Wachstumsfaktor, engl. <i>insulin-like-growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, engl. <i>inducible nitric oxide synthase</i>
IQA	Interquartilabstand
JPN	Japan
KG	Körpergewicht
µm	Mikrometer
Min	Minute
ml	Milliliter
M	Mol
mM	Millimol
MPS	Monozyten-Makrophagensystem
ms	Millisekunden
NaOH	Natriumhydroxid

NF- κ B	nuklearer Faktor „Kappa Leichtketten Verstärker“ der aktivierten B-Zelllinie, engl. <i>nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
NGF	Nervenwachstumsfaktor, engl. <i>nerve growth factor</i>
NGS	Ziegen Serum, engl. <i>normal goat serum</i>
NJ	New Jersey
NO	Stickstoffmonoxid
NY	New York
PA	Pennsylvania
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH3	phosphoryliertes Histon H3
PVC	Polyvinylchlorid
RAS	Renin-Angiotensin-System
ROI	Bereich von Interesse, engl. <i>region of interest</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, engl. <i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
rt-PA	rekombinanter gewebspezifischer Plasminogenaktivator, engl. <i>recombinant tissue-type plasminogen activator</i>
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung, engl. <i>standard deviation</i>
sog.	sogenannte/r/s/n
TGF	transformierender Wachstumsfaktor, engl. <i>transforming growth factor</i>
TIA	transitorisch ischämische Attacke
t-PA	gewebespezifischer Plasminogenaktivator, engl. <i>tissue-type plasminogen activator</i>
tMCAO	vorübergehender Verschluss der A. cerebri media, engl. <i>transient middle cerebral artery occlusion</i>

TNF	Tumor Nekrose Faktor
Trk	Tropomyosin-Rezeptor-Kinase (auch als Tyrosinkinase Rezeptor bezeichnet)
TX	Texas
USA	United States of America = Die Vereinigten Staaten von Amerika
W	Watt
WA	Washington
z.B.	zum Beispiel
$\mu\text{g}/\text{kg}$ KG	Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht
μm	Mikrometer

2 Einleitung

2.1 Schlaganfall

Epidemiologie

Gemäß dem Statistischen Bundesamt, erlitten in Deutschland im Jahr 2018 256.365 Patienten einem Hirninfarkt (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme-10 I63) (Statistisches Bundesamt 2020a) und es verstarben 15.026 Patienten an einem solchen (Statistisches Bundesamt 2020b). Von den Überlebenden eines Schlaganfalls leiden zwei Drittel unter Einschränkungen der Aktivitäten des täglichen Lebens und damit an einer langfristigen Behinderung. Dabei entsteht neben dem persönlichen ein nicht unerheblicher gesellschaftlicher Schaden. Dieser wächst mit der Krankheitsdauer durch Wegfall der Arbeitskraft und Kosten durch medizinische Versorgung und Unterstützung im Alltag. Es liegt somit im Interesse aller Involvierten, dass eine schnelle und möglichst vollständige Rehabilitation angestrebt wird.

In fast 80% der Fälle liegt einem Schlaganfall eine Schädigung durch Ischämie zugrunde (Kolominsky-Rabas et al. 2015; Ovbiagele et Nguyen-Huynh 2011), die auch Thema dieser Arbeit sind.

Risikofaktoren

Wichtige mögliche Risikofaktoren für einen Schlaganfall stellen ein arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, eine Stenose der Arteria (A.) carotis durch Plaqueablagerungen und Vorhofflimmern ohne antikoagulatorische Behandlung sowie arteriosklerotische Veränderungen im Allgemeinen dar (Janardhan et Qureshi 2004; Kernan et al. 2014).

Eine Prävention wird derzeit nur für Risikogruppen empfohlen (Kernan et al. 2014). Wichtigste Therapieansätze sind Senkung der Lipidspiegel im Blut, eine effektive Antikoagulation sowie eine konsequente Einstellung der Blutzucker- und Blutdruckwerte (Bansal et al. 2013; Powers et al. 2018).

Symptome und Einteilung

Typische, häufige klinische Symptome sind, je nach betroffenem Areal, eine motorische Schwäche (Parese) bis hin zur Plegie (Lähmung) der zur Infarktregion kontralateralen Körperhälfte (z.B. Arm, Bein und Gesicht) (Powers et al. 2018). Dabei findet sich typischerweise ein

hängender Mundwinkel, eine halbseitige Schwäche (Hemiparese) und eine verwaschene Aussprache (Dysarthrie) (Powers et al. 2018).

Generell wird unterschieden zwischen einer transitorisch ischämischen Attacke (TIA) und einem Schlaganfall. Die TIA ist inzwischen definiert: „als eine vorübergehende Episode neurologischer Ausfälle durch fokale cerebrale, Rückenmark oder retinale Ischämie ohne Infarkt.“ (Kernan et al. 2014). Der zugrundeliegende Pathomechanismus ist identisch zum Schlaganfall. Entsprechend gilt eine stattgehabte TIA als Prodrom eines möglichen zukünftigen Schlaganfalls (Kernan et al. 2014). Der ischämische Schlaganfall zeigt, im Unterschied zur TIA, keine vollständige Rückbildung der Symptome, ist per Definition auf das Gehirn beschränkt und bedarf entweder eines neuropathologischen oder radiologischen Nachweises (Kernan et al. 2014).

Pathomechanismen

Bei einem ischämischen Schlaganfall ist die Blut- und damit Sauerstoffzufuhr eines Versorgungsgebietes, zum Beispiel durch einen Thrombus, unterbrochen (Hu et al. 2017). Hier ist zwischen einem Verschluss der kleinen Gefäße (engl. *small vessel disease*) und dem größerer Gefäße hinsichtlich der Ausprägung der Symptomatik und der Pathophysiologie zu unterscheiden (Hu et al. 2017). Thromben entstehen typischerweise entweder kardiembolisch (Kernan et al. 2014; Ovbiagele et Nguyen-Huynh 2011) oder durch Auflagerung auf eine rupturierte Plaque der Gefäßwand (Hu et al. 2017). Die Thromben oder der Inhalt einer Plaque nach Ruptur lösen sich im Verlauf von der Gefäßwand und verschließen ein nach peripher enger werdendes Gefäß (Hu et al. 2017).

Die ischämische Läsion gliedert sich in zwei Zonen: Den Kern der Ischämie und die Penumbra, welche dem umgebenden Gewebe entspricht und zusätzlich durch Gefäßkollateralen versorgt wird (Astrup et al. 1981; Janardhan et Qureshi 2004; Lee. et al. 2018). Das Gewebe im Kern ist funktionelles Endstromgebiet und damit zwingend auf die Sauerstoffversorgung durch das verschlossene bzw. zerstörte Gefäß angewiesen. Der Erhalt dieses Bereiches durch medizinische Maßnahmen gilt als unrealistisch (Jonas et al. 1997; Onténiente et al. 2003).

Ursächlich für die Zellschädigung ist eine Hypoxie im jeweiligen Versorgungsgebiet (Janardhan et Qureshi 2004). Eine Nervenzelle ohne Sauerstoffzufuhr kann noch für ein bis zwei Minuten ihren Stoffwechsel aufrecht erhalten (Janardhan et Qureshi 2004). Für weitere drei Minuten können basale Zellfunktionen mittels anaerober Energiegewinnung ohne

Blutversorgung aufrecht erhalten werden (Baxter et al. 2014; Lowry et al. 1964). Im Verlauf kommt es, durch den dadurch bedingten Glutamatanstieg, zum Calciumeinstrom in die Zelle und die Zellmembran depolarisiert (Janardhan et Qureshi 2004; Lee. et al. 2018). Dies entspricht einer Hyperexzitabilität (Goyal et al. 2014). Der intrazelluläre Calciumanstieg setzt dann die Apoptose bzw. Nekrose über zellinterne Prozesse, z.B. die Caspase Kaskade, in Gang (Allen et Bayraktutan 2009; Janardhan et Qureshi 2004). Dabei wird Calcium, Apoptose induzierender Faktor (engl. *apoptosis inducing factor*, AIF) und Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt (Baxter et al. 2014; Janardhan et Qureshi 2004; Onténiente et al. 2003). Cytochrom c bildet mit dem Faktor 1 zur Aktivierung der apoptotischen Protease (engl. *apoptotic protease activating factor 1*, APAF1) und Caspase 9 das Apoptosom. Dieser Komplex aktiviert Caspase 9. Caspase 9 wiederum aktiviert Caspase 3, eine sogenannte Effektorcaspase, die die Apoptose unumkehrbar einleitet (Hyman et Yuan 2012).

Die Penumbra wiederum wird zusätzlich durch Kollateralen und Diffusion versorgt und kann somit deutlich länger den notwendigen Erhaltungsstoffwechsel betreiben (Allen et Bayraktutan 2009; Astrup et al. 1981; Baxter et al. 2014; Obrenovitch 1995). Ein Funktionsverlust tritt hier ebenfalls bereits nach kurzer Zeit ein (Astrup et al. 1981). Ein Wiedereröffnen des verschlossenen Gefäßes kann zur (teilweisen) Rückkehr der Funktionsfähigkeit der dortigen Zellen führen (Janardhan et Qureshi 2004). Nicht unerwähnt sollte bleiben, dass noch weitere Faktoren wie freie Sauerstoffradikale und Entzündungsreaktionen zur weiteren Schädigung beitragen können (Janardhan et Qureshi 2004; Lee. et al. 2018).

Das aktuelle Augenmerk der akuten medizinischen Maßnahmen konzentriert sich auf eine möglichst schnelle Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung bzw. Durchblutung zum Erhalt der Penumbra, da bei ihrem Verlust das neurologische Defizit in vollem Ausmaß unwiederbringlich bestehen bleibt (Jauch et al. 2013; Powers et al. 2018).

Therapie

Die Therapie eines Schlagfalls dient der Schadensbegrenzung („time is brain“). Neben einem schnellstmöglichen Transport in ein geeignetes Krankenhaus, sollte zur schnellen Diagnosefindung mit Bewertungsskalen (z.B. die Skala der Nationalen Gesundheitsinstitute, engl. *National Institute of Health Stroke Scale*) gearbeitet werden (Powers et al. 2018). Zur Diagnosesicherung dient eine zerebrale Bildgebung mittels Computertomographie oder Magnetresonanztomographie (Jauch et al. 2013).

Die bisherigen therapeutischen Methoden einer intravenösen Lysetherapie mittels rekombinatem gewebspezifischem Plasminogenaktivator (engl. *recombinant tissue-type plasminogen activator*, rt-PA) und mechanische Thrombektomie, sind nur begrenzt verfügbar bzw. wirksam. Bei der mechanischen Thrombektomie galt bis vor kurzem noch ein enges Zeitfenster von weniger als viereinhalb Stunden. Dieses konnte inzwischen auf 24 Stunden ausgeweitet werden (Albers et al. 2018; Nogueira et al. 2018). Bei der Lysetherapie wird ein, dem körpereigenen gewebespezifischen Plasminogenaktivator (engl. *tissue-type plasminogen activator*, t-PA), nachempfundenes Enzym rt-PA, zum Beispiel Alteplase, systemisch oder lokal intravasal verabreicht (Bansal et al. 2013). Bei systemischer Gabe werden sämtliche Thromben im Gefäßsystem lysiert, was zu einem entsprechend höherem Blutungsrisiko führt (Broussalis et al. 2012). Die lokale, intraarterielle Freisetzung gestaltet sich, theoretisch, nebenwirkungsärmer (Bansal et al. 2013). Nicht alle Metaanalysen konnten jedoch einen eindeutigen Vorteil gegenüber einer systemischen intravenösen Gabe nachweisen und auch die aktuelle Leitlinie empfiehlt die Therapie zwar, weißt aber auf einen Off-Label-Use hin (Ma et al. 2015; Nam et al. 2015; Powers et al. 2018; Wardlaw et al. 2013).

Bei der mechanischen Thrombektomie gibt es verschiedene Ansätze. Allen ist gemein, dass ein Katheter unter Durchleuchtung bzw. digitaler Subtraktionsangiographie bis zum einliegenden Thrombus vorgebracht wird. Mittels einer entsprechenden Vorrichtung kann der Thrombus geborgen werden (Janardhan et Qureshi 2004; Jauch et al. 2013; Powers et al. 2018). Alternativ kann ein Stent im Bereich der Stenose platziert werden (Lapergue et al. 2017). Dabei haben diese Verfahren die Gemeinsamkeit, dass das Blutungsrisiko deutlich geringer als bei der Lysetherapie ist. Inzwischen wird empfohlen, sofern möglich, Lysetherapie und Thrombektomie zu kombinieren (Gariel et al. 2018; Goyal et al. 2018; Mistry et al. 2017; Powers et al. 2018; Tsivgoulis et al. 2017; Turc et al. 2019).

Im Anschluss wird, neben einer medikamentösen Prävention, eine Rehabilitation mit Physiotherapie und Ergotherapie empfohlen (Jauch et al. 2013; Powers et al. 2018).

Beide Methoden (rt-PA und mechanische Thrombektomie) haben den Nachteil nur für ein bestimmtes (sechs bis 16 Stunden), wenn auch inzwischen erweitertes Zeitfenster (inzwischen bis 24 Stunden), nach Symptombeginn zur Verfügung zu stehen (Powers et al. 2018). Da sich nicht wenige Schlaganfälle gerade nachts ereignen, die erst am nächsten Morgen bemerkt werden (sog. „Wake-up-Stroke“), entfallen für diese Patientengruppe, aufgrund der ungewissen Risiko-Nutzen-Konstellationen durch den unbekanntem Ereigniszeitpunkt, meist die oben genannten Therapiemaßnahmen oder sind mit deutlich höheren Risiken (da

Nebenwirkungen) behaftet (Powers et al. 2018). Patienten deren Ereignis länger als 24 Stunden zurückliegt, steht dann nur ein rein konservatives Procedere (Physio- und Ergotherapie) zur Verfügung (Powers et al. 2018).

Insgesamt ist die aktuelle Therapie nicht zufriedenstellend, denn sie steht nicht jedem Patienten zur Verfügung und beschränkt sich maßgeblich darauf weiteren Schaden zu verhindern und kann nicht bereits entstandenen Schaden „reparieren“. Die Entwicklung weiterer neuer Methoden und Medikamente gestaltet sich aufwendig und ist sehr kostenintensiv (Bennion et al. 2015a; Onténiente et al. 2003). Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem neuen, bisher nicht verwendeten Ansatz mittels Substanzen analog des hirneigenen Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Das zerebrale Renin-Angiotensin-System entspricht in seinem Aufbau dem bereits länger bekannten, peripheren RAS (Freund et al. 2012; Wright et Harding 1994).

2.2 Das periphere Renin-Angiotensin-System

Das klassische Renin-Angiotensin-System dient dem Organismus, unter anderem, zur Regulation des Blutdrucks durch Vasokonstriktion (Peach 1977). Die Zellen des juxtaglomerulären Apparates in der Niere sezernieren Renin um eine Verminderung der renalen Durchblutung zu bewirken (Peach 1977). Angiotensinogen, das Substrat von Renin, einer Aspartyl-Protease, wird im Leberparenchym gebildet und in das Blut sezerniert (Peach 1977). Dort erfolgt dann durch Renin die enzymatische Spaltung des Propeptides Angiotensinogen zu Angiotensin I (Ang I) (Peach 1977). Dieses, nun zehn Aminosäuren lange, Peptid wiederum wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (engl. *angiotensin-converting-enzyme*, ACE) in Angiotensin II (Ang II), ein Oktapeptid, gespalten (Iusuf et al. 2008). Die Benennung des Systems erfolgte nach der Entdeckung von Renin durch *Tigerstedt und Bergmann* 1898 und von Angiotensin 1934 durch *Goldblatt et al.* sowie durch spätere Forschungen argentinischer und amerikanischer Forschergruppen (Basso et Terragno 2001; Goldblatt et al. 1934; Tigerstedt et Bergman 1898).

Später fand man weitere Enzyme und Endprodukte: So kann aus Angiotensinogen mittels Cathepsin G oder Tonin direkt Ang II entstehen. Auch kann durch Aminopeptidase A Angiotensin III gebildet werden, das den Aminosäuren 2-8 des Angiotensinogen entspricht. Dann wiederum kann durch Aminopeptidase N eine weitere Aminosäure abgespalten werden

und es entsteht Angiotensin IV mit den Aminosäuren 3-8 des Angiotensinogen. Angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)) entsteht entweder durch Spaltung von Ang I durch Prolyl-Endopeptidasen und neutrale Endopeptidase 24.11 oder durch Carboxypeptidase P die Angiotensin III als Substrat nutzt. Die Prolyl-Endopeptidasen und die Prolyl-Carboxypeptidasen sind in der Lage Ang II zu Ang-(1-7) zu spalten. Ebenso wie das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (engl. *Angiotensin-Converting-Enzyme2*, ACE2). Dieses spaltet sowohl Ang II zu Ang-(1-7) als auch Ang I zu Angiotensin-(1-9), wobei es eine 400-fach höhere Affinität zu Ang II als zu Ang I hat (Iusuf et al. 2008; von Bohlen und Halbach 2005).

Nomenklatur der Angiotensine

Die Nomenklatur der verschiedenen Angiotensine ist komplex aber logisch. Der Bezugspunkt das Peptid Angiotensinogen mit 14 Aminosäuren. Im weiteren Verlauf werden Aminosäuren abgespalten. Die Produkte heißen dann, sofern sie keine weiteren Eigennamen erhalten haben, nach der Position der verbliebenen Aminosäuren am jeweiligen N- bzw. C-terminalen Ende.

Das zerebrale Renin-Angiotensin-System

Das zerebrale RAS ist in seiner Funktion weitgehend unabhängig, da sämtliche Angiotensine, unter physiologischen Bedingungen, nicht in der Lage sind oder nur schwer die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Entsprechend lassen sich im Gehirn RAS Enzyme wie ACE 1 und ACE 2 nachweisen, die Angiotensinogen zu weiteren RAS Substraten spalten und dadurch eine Autoregulation ermöglichen (Ganten et al. 1971; Ganten et Speck 1978; von Bohlen und Halbach et Albrecht 2006; Wright et Harding 2011). Renin jedoch kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und hat entsprechenden Einfluss auf die Regulation des RAS im Gehirn, eine gänzliche Unabhängigkeit besteht also nicht (Ganten et al. 1971; Ganten et Speck 1978; von Bohlen und Halbach et Albrecht 2006; Wright et Harding 2011).

Seit Beschreibung des zerebralen RAS durch *Ganten et al.* (Ganten et al. 1971; Ganten et Speck 1978) und der Beschreibung der Rezeptorverteilung durch *Wright und Harding* 1994 (Wright et Harding 1994), wurde das hirneigene RAS intensiv beforscht (von Bohlen und Halbach et Albrecht 2006; Wright et Harding 2011). 2011 erfolgte die Entdeckung der Wirkung von Ang-(1-7) auf das Gehirn nach einem Schlaganfall durch *Mecca et al.* (Mecca et al. 2011), nachdem bereits zuvor *Tallant et al.* 2005 ein positiven Effekt auf Umbauprozesse am Herzen, sprich auf das Remodeling des Herzens, nach stattgehabtem Infarkt beschrieben hatten (Tallant et al. 2005).

Neuroprotektive Effekte des Renin-Angiotensin-Systems

Ang-(1-7) ist ein Peptid aus sieben Aminosäuren: Aspartat-Arginin-Valin-Tyrosin-Isoleucin-Histidin-Prolin, die ersten sieben Aminosäuren des Ursprungspeptides Angiotensinogen (Jiang et al. 2013). Es bindet an den Angiotensin II Typ 2 Rezeptor (AT-2R) und den MAS-Rezeptor (Santos et al. 2003). Letzter interagiert mit dem Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT-1R) als Heterodimer und mit Bradykinin-Rezeptoren (Bennion et al. 2015a). Dadurch wirkt es der durch Ang II vermittelten Wirkung mittels der AT-2R-Wirkung entgegen (Bennion et al. 2015a). Ang-(1-7) wirkt antiinflammatorisch durch Reduktion der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) (Mecca et al. 2011). Durch Hochregulation der Synthese der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (engl. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) bewirkt es zudem eine Vasodilatation, verbessert dadurch den zerebralen Blutfluss (Bennion et al. 2015b; Mecca et al. 2011; Santos et al. 2008) und über die vermehrte Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese in Thrombozyten, wirkt es antithrombotisch (Jiang et al. 2013). Darüber hinaus vermindert Ang-(1-7) die Expression des nukleären Faktors „Kappa Leichtketten Verstärker“ der aktivierten B-Zelllinie (engl. *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*, NF- κ B) und des Tumor Nekrose Faktors α (TNF α) und hat damit Einfluss auf die Apoptose (Bennion et al. 2015a). Die Reduktion des NF- κ B verringert die Leukozytenmigration nach einem ischämischen Schlaganfall (Bennion et al. 2015a). Ang-(1-7) hemmt zudem das Wachstum von Fibromyozyten (Zhang et al. 2010). Außerdem beeinflusst Ang-(1-7) mittels des MAS-Rezeptors die adulte Neurogenese in Mäusen und Ratten (Freund et al. 2013). In diesem Zusammenhang steht auch das Vorkommen des MAS-Rezeptors im Gehirn. Der MAS Rezeptor wird insbesondere im Stratum granulosum des Gyrus dentatus und im Stratum pyramidalis in der Region eins bis drei des Cornu Ammonis des Hippocampus und im piriformen Cortex exprimiert (Freund et al. 2012). Insbesondere im Hippocampus konnte adulte Neurogenese nachgewiesen werden (von Bohlen und Halbach 2011). Ob der piriforme Cortex eine Beteiligung an der adulten Neurogenese hat, wird noch diskutiert. Einig ist man sich aber, dass ortsständige Neurone zu einer gewissen neuronalen Plastizität befähigt sind (Freund et al. 2012; Klempin et al. 2011; Rossi et al. 2014). Außerdem konnte der MAS-Rezeptor auf der Oberfläche von Mikroglia Zellen nachgewiesen werden und moduliert dadurch die postischämische Entzündungsreaktion (Arroja et al. 2016; Mecca et al. 2011; Regenhardt et al. 2013). Nebenbei ist der Hippocampus besonders anfällig für ischämische

Ereignisse und wird mit dem postischämischen Lernprozess in Verbindung gebracht (Chen et al. 1998; Lee. et al. 2018).

Die Ausnutzung dieser Effekte, insbesondere die verminderte Apoptoserate, die Reduktion der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS), die Entzündungshemmung und der positive Einfluss auf die adulte Neurogenese, könnten wichtige Ansatzpunkte im Rahmen der Therapie eines ischämischen Ereignisses bzw. Schlaganfalls darstellen.

Wie bereits erwähnt, ist das Gehirn mit einem relativ autonomen RAS ausgestattet, der intrazerebroventrikuläre Applikationsweg wird daher seit Entdeckung des hirneigenen RAS genutzt, da die Angiotensine als hydrophile Peptide nur schwer Blut-Hirn-Schranken gängig sind. Zwar wurde bereits durch *Wright und Harding* 1994 (Wright et Harding 1994) ein Effekt auf das Gehirn über die zirkumventrikulären Organe beschrieben und auch 2011 nochmal bestätigt (Wright et Harding 2011). Ein klinisch-praktischer Nutzen lässt sich, aufgrund der damit verbundenen Risiken und Probleme, aber nur schwer ableiten.

Vorversuch der Firma Pharmaseed Ltd.

Der vorliegenden Arbeit voraus ging ein Tierversuch, der die subkutane Applikation eines Ang-(1-7) Derivates nach einem ischämischen Schlaganfall in Ratten untersuchte (Krakovsky 2014). In den Verhaltensversuchen während und nach der Applikation zeigte sich eine signifikante Besserung der mit Wirkstoff behandelten Tiere gegenüber der mit phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) behandelten Kontrollgruppe (Krakovsky 2014). Nach den Verhaltensversuchen wurden die Tiere euthanasiert und die Gehirne zur Verfügung gestellt.

2.3 Zielsetzung

Um die oben angesprochenen Effekte von Ang-(1-7), insbesondere die Beeinflussung der adulten Neurogenese, zu untersuchen, wurden jeweils ein Marker für Neurogenese (Doublecortin), ein Marker für Zellteilung (phosphoryliertes Histon H3) und ein Marker für Zelltod (aktivierte Caspase 3) ausgewählt. Um die Immunreaktion beurteilen zu können wurde zudem noch ein Marker für aktivierte Mikroglia (IBA1) genutzt.

Nach über 20 Jahren Forschung in diesem Gebiet und der gesicherten positiven Wirkung von Ang-(1-7) nach einem Schlaganfall im Tiermodell ist der hier gewählte Versuchsaufbau deutlich realitätsnaher:

- die Tiere erhielten 24h nach dem ischämischen Ereignis erstmalig eine Applikation, nicht wie üblich direkt nach herbeigeführten Schlaganfall,
- es erfolgte die Applikation subkutan (s.c.) und nicht intrazerebroventrikulär und
- die Therapie wurde über 28 Tage fortgeführt, nicht wie sonst üblich nach 24h beendet.

Entsprechend bietet dieses Modell erstmalig einen Versuchsaufbau, der sehr nah einem möglichen späteren klinischen Einsatzgebiet ist.

Diese Arbeit untersucht den möglichen Effekt der subkutanen Gabe von Ang-(1-7)-Derivaten für 28 Tage nach einem ischämischen Schlaganfall auf die adulte Neurogenese im Hippocampus der Ratte im Vergleich zu einer mit PBS behandelten Kontrollpopulation (im Folgenden „Kontrollgruppe“ genannt). Sowie ob sich mögliche Veränderungen der Doublecortin, der phosphorylierten Histon H3, der aktivierte Caspase 3 positiven Zellzahlen und ein messbarer Volumenunterschied zwischen der Gesunden und der ischämisch geschädigten Hemisphäre (im Folgenden als „ischämische Hemisphäre“ bezeichnet) findet.

Entsprechend wurden folgende Fragestellungen formuliert:

Hauptfragestellung

Hat die 28-tägige Gabe von Ang-(1-7) nach einem ischämischen Schlaganfall, verglichen mit einer unbehandelten Population, einen Effekt auf die adulte Neurogenese im Hippocampus der Ratte?

Nebenfragestellungen

- Gibt es eine signifikante Veränderungen der Doublecortin, phosphorylierten Histon H3 oder Caspase 3 positiven Zellen im Gyrus dentatus?

- Zeigt sich ein messbarer Volumenunterschied zwischen der gesunden und der ischämischen Hemisphäre?
- Besteht ein signifikanter Unterschied in der Immunreaktion nach Ang-(1-7) Gabe im Vergleich zu einer unbehandelten Population?

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei der Studie handelt es sich um eine randomisierte Therapiestudie/Interventionsstudie im Tiermodell der Ratte.

3.2 Vorversuch durch die Firma Pharmaseed Ltd.

Im Folgenden werden die Vorversuche, die durch die Firma Pharmaseed Ltd. durchgeführt wurden, kurz erläutert. Im Anschluss an diese Versuche wurden die Tiere euthanasiert und die in Paraformaldehyd (PFA) fixierten Gewebeproben zur Verfügung gestellt.

tMCAO – Vorrübergehender Verschluss der A. cerebri media

Zu Studienbeginn standen 46 männliche Sprague Dawley Ratten zur Verfügung. Von diesen starben 14 während der Studie. Am Tag eins der Studie erhielten alle Tiere ein vorübergehender Verschluss der A. cerebri media (engl. *transient middle cerebral artery occlusion*, tMCAO) (Krakovsky 2014). Erstmals beschrieben wurde dieses Vorgehen 1986 von *Koizumi et al.* und seither angepasst und weiterentwickelt (Koizumi et al. 1986; Sommer 2017).

Versuchsverlauf

24 Stunden nach diesem Eingriff erhielten die Tiere, je nach Gruppe, entweder Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS), 50 µg/kg KG subkutan (s.c.) TXA-301 oder 50 µg/kg KG s.c. TXA-302. Die Injektionen erfolgten täglich über einen Zeitraum von 28 Tagen (Krakovsky 2014).

Zur Therapieverlaufskontrolle erfolgten folgende Verhaltensversuche und die Bestimmung eines neurologischen Punktwertes:

- „Platzieren der Vorderpfoten“ (engl. *forelimb placing*):
- “Schritt Test” (engl. *stepping test*):
- Bestimmung eines neurologischen Punktwertes (engl. *neurological test score*):

Der neurologische Punktwert wurde entsprechend eines modifizierten Punktesystems ermittelt (Germanò et al. 1994; Chen J et al. 2001).

- “Schwingtest” (engl. *body swing test*):

Diese Tests wurden vor der Operation und insgesamt sechsmal postoperativ durchgeführt. Eine Bestimmung des neurologischen Punktwertes (engl. *neurological test score*) erfolgte zusätzlich an Tag zwei. An Tag 50 wurde, unter Narkose, mittels Flow-R Laser Doppler System der intrakranielle Blutfluss sowie Gefäßdurchmesser bestimmt.

An Tag 51 erfolgte die Tötung unter Narkose mit anschließender transkardialer Perfusion mit gepuffertem PFA. Gehirn, Herz, ein Leberlappen, Milz, Nieren und Pankreas wurden entnommen und in gepuffertem PFA gelagert (Krakovsky 2014). Eine solche PFA Gewebefixierung wurde zum Beispiel durch *Fox et al.* 1985 beschrieben (Fox et al. 1985)

Ergebnisse des Vorversuchs der Firma Pharmaseed Ltd. (Krakovsky 2014)

Beim Vergleich der neurologischen Tests ergaben sich einige, signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe.

Der neurologische Punktwert war ab Tag 15 signifikant besser in den behandelten Gruppen TXA301 und TXA302 als in der mit DPBS behandelten Kontrollgruppe. Beim "Schritt Test" zeigten sich die Gruppen TXA301 und TXA302 ab Tag 15 signifikant besser als die Kontrollgruppe. Beim Test „Platzieren der Vorderpfoten“ und beim „Schwingtest“ waren die Ergebnisse der Gruppe TXA301 ab Tag 22 und der Gruppe TXA302 ab Tag 15 jeweils signifikant besser als die Kontrollgruppe.

Die gemessenen Blutflüsse und Gefäßdurchmesser an Tag 50 waren, sowohl in der Gruppe TXA301 als auch in der Gruppe TXA302, signifikant mehr bzw. größer als in der Kontrollgruppe (Krakovsky 2014).

3.3 Versuche dieser Arbeit

Als Ausgangsproben standen die PFA fixierten Gehirne der Firma Pharmaseed Ltd. zur Verfügung.

Gewichts- und Volumenbestimmung der Gehirne

Die klassische Volumetrie und eine Publikation von *Douglass et al.* dienten als Grundlage der, im Zuge dieser Arbeit, etablierten Methode zur Volumenbestimmung (Douglass et Wcislo 2010).

Vorbereitung

Zunächst wurde, durch einen Schnitt mit einer Bügelklinge (Herkenrath, DE) auf Höhe der Lamina tectalis, das Cerebrum vom Cerebellum getrennt.

Der Versuchsaufbau gestaltete sich wie in Abbildung 1 dargestellt: als Gefäß diente eine 10 Milliliter (ml) Spritze (Becton Dickinson GmbH, DE) ohne Stempel. Diese wurde an einem Stativ so befestigt, dass der Spritzenkonus nach unten zeigte. An diesem wiederum wurde ein Stück Infusionsschlauch aus Polyvinylchlorid (PVC) befestigt. Das andere Ende des Schlauches wurde mit einem Dreiwegehahn (B. Braun Melsungen AG, DE) verbunden an dem zwei 1 ml (B. Braun Melsungen AG, DE) Spritzen aufgesteckt waren.

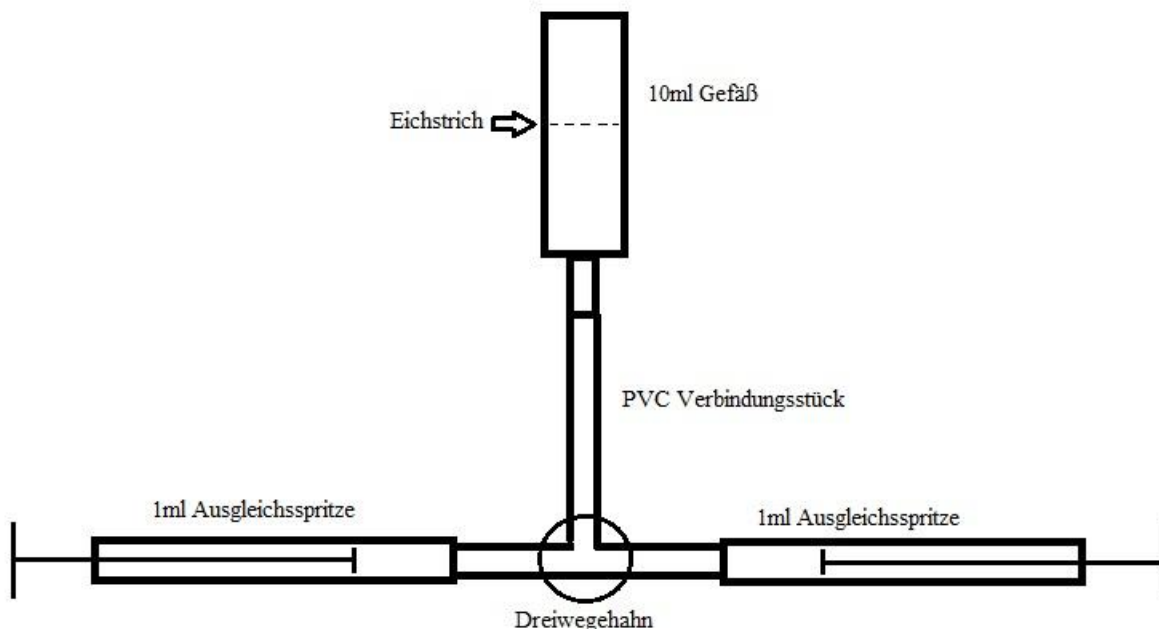


Abbildung 1 – Aufbau der Volumenbestimmung: 1) Einstellung des Flüssigkeitsspiegels auf Höhe des Eichstriches, 2) Einbringen der Probe in das 10ml Gefäß, 3) erneutes Einstellen des Flüssigkeitsspiegels auf den Eichstrich und Ablesen des Volumens auf den Ausgleichsspritzen. (10ml Spritze: Becton Dickinson GmbH, DE; 1ml Spritze: B. Braun Melsungen AG, DE; Dreiwegehahn: B. Braun Melsungen AG, DE; Bilderstellung: Microsoft Paint, USA)

Klassische Volumetrie

Vor einer Messung wurde das System mit PFA befüllt und entlüftet. In der 10 ml Spritze (Becton Dickinson GmbH, DE) diente die 6 ml Marke als Eichstrich, an dem der untere Rand des Meniskus so eingestellt wurde, dass sich der Meniskus und der Eichstrich gerade so berührten. Ein möglicher Überstand konnte in einer der 1 ml Spritzen (B. Braun Melsungen AG, DE) abgelesen werden. Nach Abtrocknen und Wiegen des Gehirns wurde dieses in die

10 ml Spritzenhülle eingeführt. Der durch das Einführen des Gehirns entstandene Überstand konnte nun durch Wiedereinstellen des Eichstriches mit Hilfe der beiden 1 ml Spritzen abgelesen werden. Er entsprach dem Volumen des Gehirnes inklusive des Anfangsüberstandes.

Für jedes ganze Gehirn wurde dieser Vorgang drei Mal wiederholt. Anschließend wurde das Gehirn entlang der Fissura longitudinalis (Interhemisphärenspalt) halbiert und jede Hemisphäre für sich getrennt drei Mal gemessen.

Schneiden am Vibratom

Noch vorhandene PFA Reste wurden durch Phosphat-gepufferter-Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline* (PBS)) abgewaschen. Anschließend wurde die Probe in 4%-igem Agar-Agar in PBS gebettet und das Gehirn über Nacht bei 4 Grad Celsius (°C) im Kühlschrank belassen. Der Agar-Agar Block wurde rostral mittels Bügelklinge (Herkenrath, DE) angeschnitten und gleichmäßig mit Cyanoacrykleber (Uhu GmbH & Co KG, DE) auf dem Schneidetisch des Vibratoms (Leica, DE) festgeklebt. Die beiden Hemisphären jedes Gehirns wurden mittels Vibratom in 40 Mikrometer (μm) dicke koronare Scheiben geschnitten.

Während des Schneidens mit dem Vibratom (Geschwindigkeit 4,7-4,9; Frequenz 7,5; Schnittdicke 40 μm) wurden die Schnitte mit einem Pinsel aufgefangen und in eine mit 20%-igem Ethanol befüllte 24-Well-Platte (Greiner, DE) gegeben.

Pro Färbung wurde jeder dritte Schnitt auf einen Objektträger (Langenbrinck, DE) aufgezogen. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einer kleinen Vakuumsaugpumpe abgesaugt. Nach dem Trocknen auf dem Objektträgerstrecktisch (medite medizintechnik, DE) wurden die Objektträger über Nacht bei 37 °C in einem Hybridisierungsöfen (Labnet, NJ USA) getrocknet.

Immunhistochemische Fluoreszenz Färbung der Gehirne

Die einzelnen Protokolle, mit Ausnahme der IBA1 Färbung, waren bereits in der Arbeitsgruppe etabliert und standardisiert:

- Doublecortin (Freund et al. 2013)
- phosphoryliertes Histon H3 (Freund et al. 2013; Poser et al. 2015)
- aktivierte Caspase 3 (Freund et al. 2013)

Standardprotokoll

Nach 5-minütigem Waschschrift mit Aqua bidest auf einen Kreisschüttler (GFL, DE) wurden die Objektträger in eine mikrowellentaugliche Küvette überführt die mit 10 Millimol (mM) Citratpuffer (pH 6,0) befüllt war. Nach insgesamt 20 Minuten bei 800 Watt in der Mikrowelle (Clatronic, DE) war das Gewebe ausreichend permeabilisiert. Das Abkühlen erfolgte für 20 Minuten in einem Wasserbad unter fließendem Leitungswasser. Es folgten ein 5-minütiger Waschschrift in Aqua bidest und zwei jeweils 5-minütige Waschschriften in PBS. Danach wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer mit Aqua bidest überführt. Die Schnitte wurden mit einem Lipidstift (Daido Sangjo Co. Ltd., JPN) umfahren, um ein Herunterlaufen der aufgetragenen Lösung zu verhindern. Dann erfolgte eine färbungsspezifische Vorbehandlung mit anschließenden Waschschriften, Aufbringen des primären Antikörpers (je nach Färbung), Inkubation und entsprechende sekundäre Antikörper. Anschließend erfolgten drei Waschschriften in PBS à fünf Minuten und eine Inkubation mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid (DAPI) Färbung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE) 1:10.000 verdünnt in Aqua bidest für fünf Minuten. Vor dem Eindecken mit Mowiol erfolgte ein letzter Waschschrift in Aqua bidest für fünf Minuten Die Schnitte wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Doublecortin (DCX) Färbung

Hier wurde nach erfolgter Überführung in die feuchte Kammer eine 30-minütige Permeabilisierung mittels 0,4%-igem Triton X-100 in PBS vorgenommen. Anschließend folgte ein Waschschrift in PBS und Blockierung mittels 3%-igem Pferdeserum und 0,3%-igem Triton X-100 in PBS über 60 Minuten. Der primäre Antikörper (Doublecortin (C-18): sc-8066, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) wurde 1:100 verdünnt in 3%-igem Pferdeserum und 0,1%-igem Triton X-100 in PBS aufgebracht. Die Inkubation erfolgte über 72 Stunden bei 4 °C. Nach anschließenden drei Waschschriften wurde der sekundäre Antikörper (biotinyliertes anti-Ziege IgG (H+L), Vector Laboratories, USA) 1:200 verdünnt in 3%-igem Pferdeserum und 0,1%-igem Triton X-100 für zwei Stunden inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften wurde der fluoreszierende Antikörper (CyTM3-konjugiertes Streptavidin, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA) 1:2000 verdünnt in PBS für zwei Stunden inkubiert. Der weitere Ablauf entsprach dem Standardprotokoll. Bei korrekt durchgeführter Färbung ergab sich ein mikroskopisches Bild wie in Abbildung 2 dargestellt.

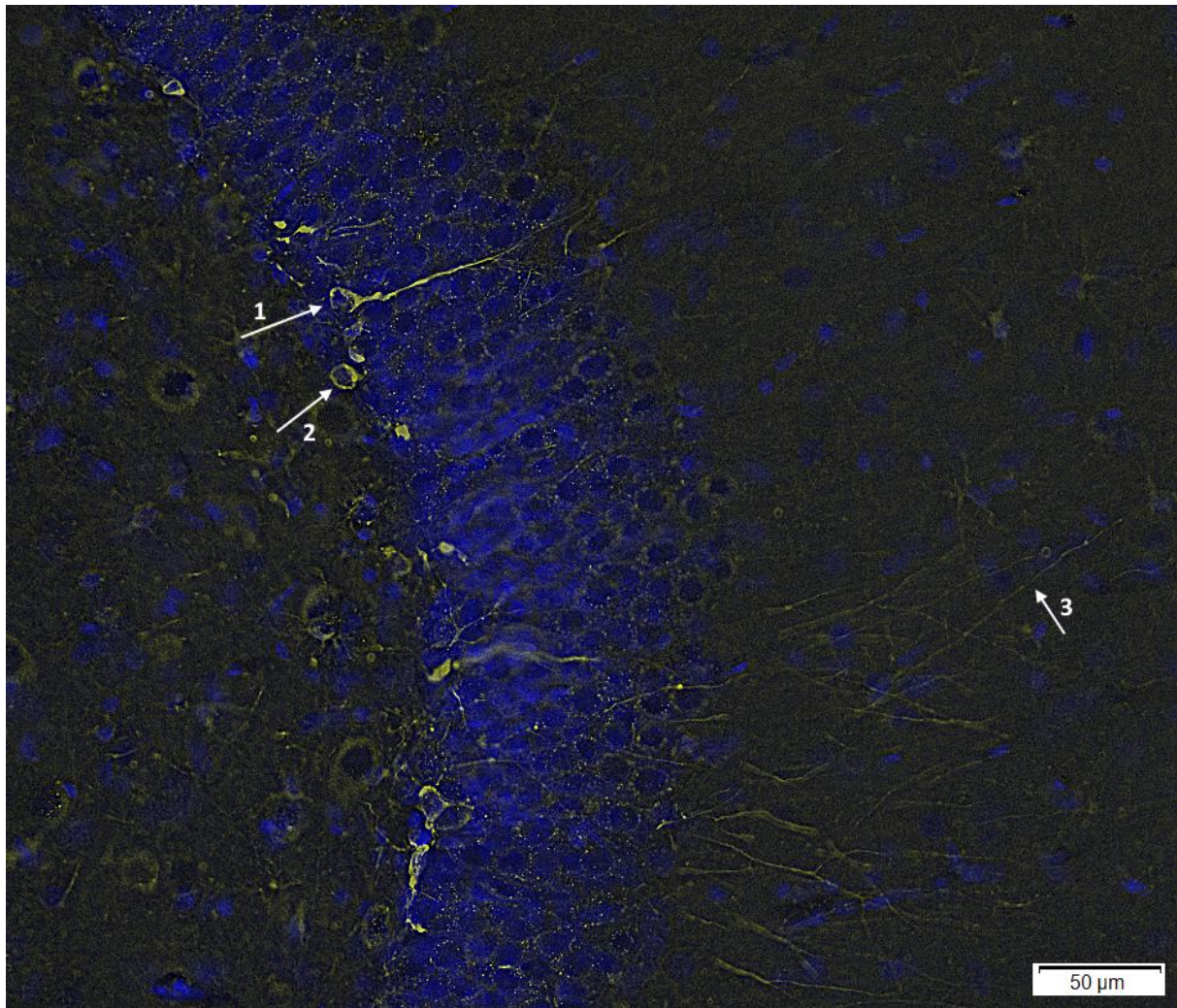


Abbildung 2 – Dargestellt ist ein Schnitt des Gyrus dentatus. Zu sehen sind Doublecortin positive Neurone (gelb) in unterschiedlichen Reifestadien. 2) zeigt eine Progenitorzelle im Stratum subgranulosum. 1) ein sich entwickelndes Neuron. 3) die Soma der hier Doublecortin positiven Dendriten befinden sich außerhalb der Schnitteben. Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI-Kernfärbung). Die Aufnahmen erfolgten mit einem Olympus BX 63 Mikroskop (Objektiv 20x) mit der Software CellSens (Olympus, JPN) (Bildbearbeitung: Dekonvolutionsalgorithmus „nearest neighbour“, Zuschnitt und Markierung: Microsoft Paint, USA).

Phosphoryliertes Histon H3 (pH3)

Hier wurde nach erfolgter Überführung in die feuchte Kammer eine Blockierung mit 5%-igem Ziegen Serum (NGS) und 5%-igem bovinem Serumalbumin (BSA) und 0,1%-igem Triton X-100 in PBS für 60 Minuten vorgenommen. Nach einem Waschschrift wurde der primäre Antikörper (p-Histon H3 (Ser 10)-R: sc-8656-R, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) 1:200 verdünnt in 1%-igem NGS und 0,1%-igem Triton X-100 in PBS für zwei Stunden inkubiert. Nach drei Waschschriften wurde der sekundäre Antikörper (CyTM3-

konjugiertes AffiniPure Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA) 1:400 verdünnt in 1%-igem NGS und 0,1%-igem Triton X-100 in PBS für 60 Minuten inkubiert. Der weitere Ablauf entsprach dem Standardprotokoll. Bei korrekt durchgeführter Färbung ergab sich ein mikroskopisches Bild wie in Abbildung 3 dargestellt.

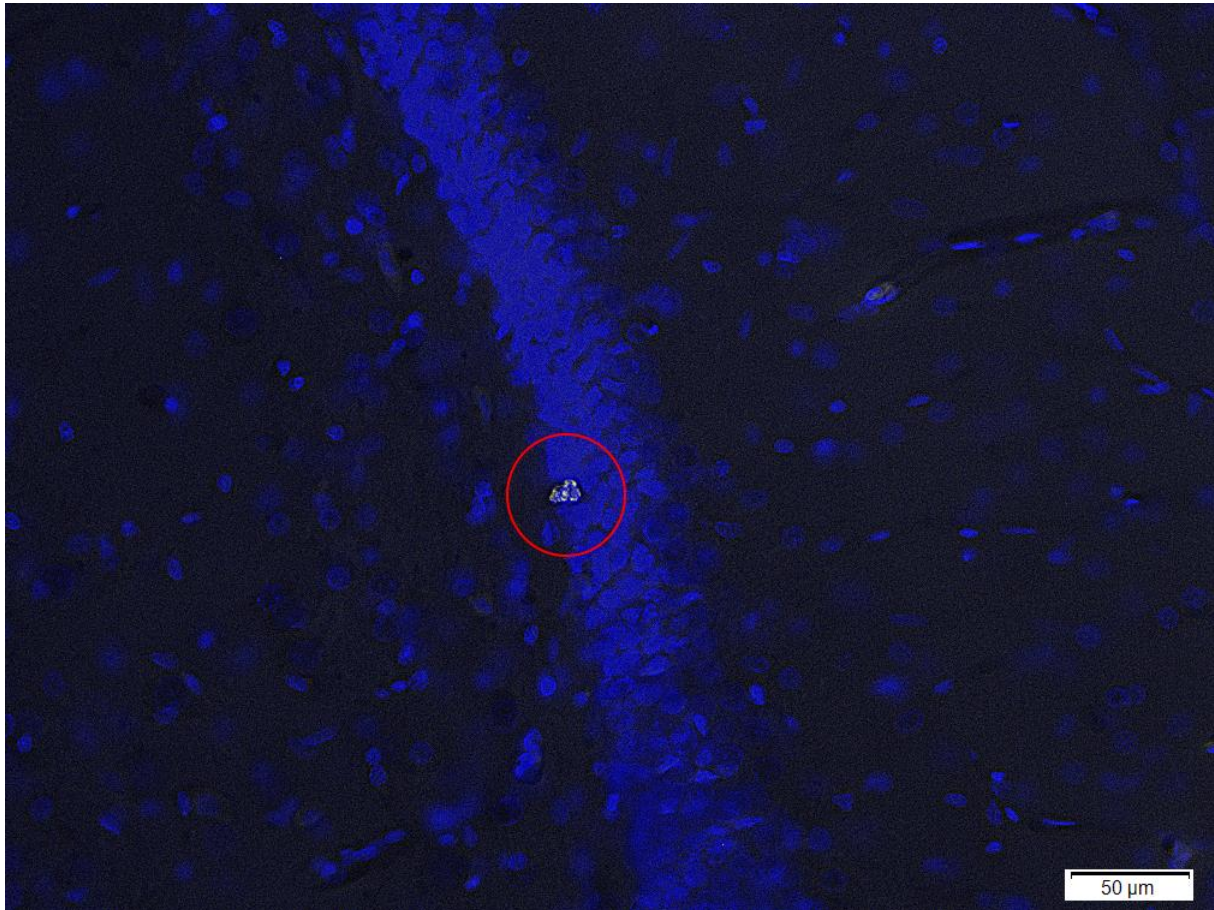


Abbildung 3 - Dargestellt ist ein Schnitt des Gyrus dentatus. Zu sehen ist ein pH3 positiver Zellkern (gelb mit rotem Kreis), sonstige Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI-Kernfärbung). Die Aufnahmen erfolgten mit einem Olympus BX 63 Mikroskop (Objektiv 20x) mit der Software CellSens (Olympus, JPN) (Bildbearbeitung: Dekonvolutionsalgorithmus „nearest neighbour“, Zugschnitt und Markierung: Microsoft Paint, USA).

Aktivierte Caspase 3

Hier wurde nach erfolgter Überführung in die feuchte Kammer die Blockierung mit 3%-igem NGS und 0,1%-igem Triton X-100 in PBS für 60 Minuten vorgenommen. Nach einem Waschschrift wurde der primäre Antikörper (Anti-aktive Caspase 3; #AB3623 Kaninchen polyklonal; Millipore, USA) 1:500 verdünnt in 3%-igem NGS und 0,1%-igem Triton X-100 in PBS über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach drei Waschschriften wurde der

sekundäre Antikörper (CyTM3-konjugiertes AffiniPure Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA) 1:200 verdünnt in 3%-igem NGS und 0,1%-igem Triton X-100 in PBS für 60 Minuten inkubiert. Der weitere Ablauf entsprach dem Standardprotokoll. Bei korrekt durchgeführter Färbung ergab sich ein mikroskopisches Bild wie in Abbildung 4 dargestellt.

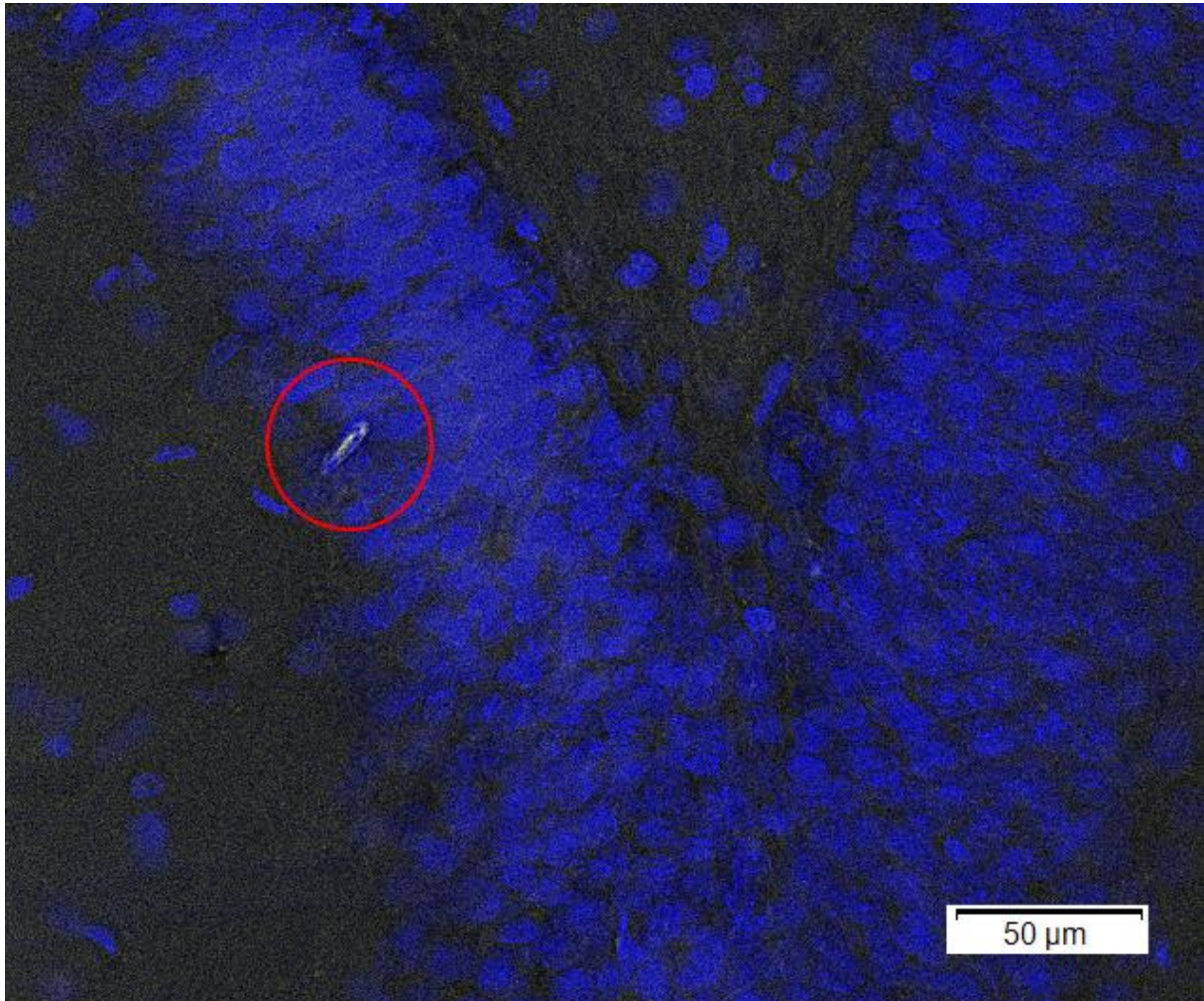


Abbildung 4 - Dargestellt ist ein Schnitt des Gyrus dentatus. Zu sehen ist ein Caspase 3 positive Zelle (gelb mit rotem Kreis), sonstige Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI-Kernfärbung). Die Aufnahmen erfolgten mit einem Olympus BX 63 Mikroskop (Objektiv 20x) mit der Software CellSens (Olympus, JPN) (Bildbearbeitung: Dekonvolutionsalgorithmus „nearest neighbour“. Zuschnitt und Markierung: Microsoft Paint, USA).

Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül-1 (IBA1)

Hier wurde nach erfolgter Überführung in die feuchte Kammer die Blockierung mit 3%-igem NGS und 0,1%-igem Triton X-100 in PBS für 60 Minuten vorgenommen. Nach einem Waschschrift wurde der primäre Antikörper (Anti-IBA1; #019-19741 Kaninchen polyklonal;

Wako, JPN) 1:500 verdünnt in 3%-igem NGS und 0,1%-igem Triton X-100 in PBS über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurde der sekundäre Antikörper (CyTM3-konjugiertes AffiniPure Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA) 1:200 verdünnt in 3%-igem NGS und 0,1%-igem Triton X-100 in PBS für 60 Minuten inkubiert. Der weitere Ablauf entsprach dem Standardprotokoll. Bei korrekt durchgeführter Färbung ergab sich ein mikroskopisches Bild wie in Abbildung 5 dargestellt.

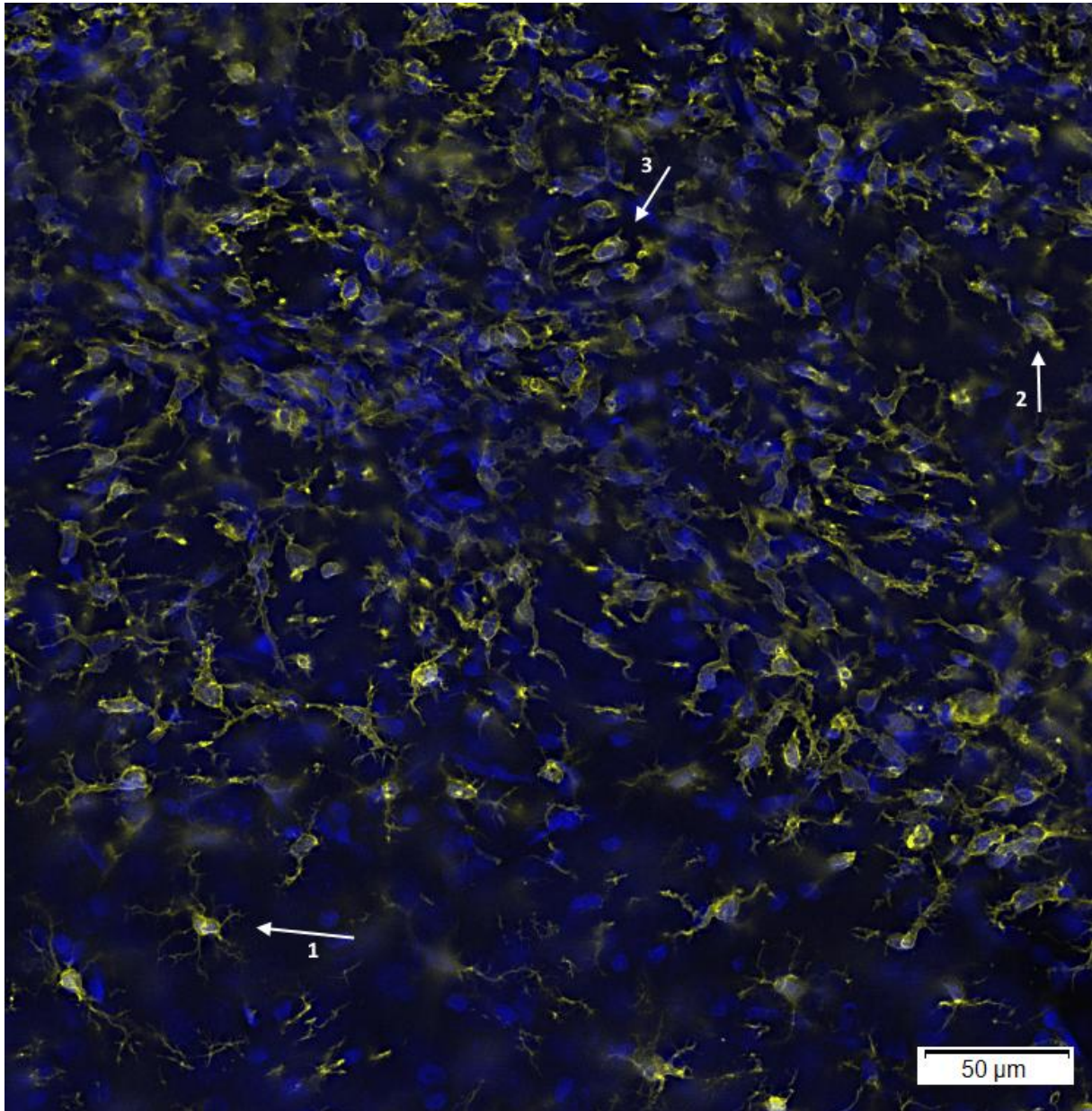


Abbildung 5 – Dargestellt ist ein Schnitt einer Hemisphäre an der Randzone zum ischämisch geschädigten Areal. Zu sehen sind IBA1 positive Mikroglia (gelb), sonstige Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI-Kernfärbung). 1) eine ruhende Mikrogliazelle mit weit verzweigten dendritischen Fortsätzen. 2) und 3) exemplarische aktivierte Mikrogliazellen ohne Zellfortsätze. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Olympus

BX 63 Mikroskop (Objektiv 20x) mit der Software CellSens (Olympus, JPN) (Bildbearbeitung: Dekonvolutionsalgorithmus „nearest neighbour“, Zuschnitt und Markierung: Microsoft Paint, USA).

Mikroskopische Auswertung

Die gefärbten Doublecortin (DCX), phosphoryliertes Histon H3 (pH3) und Caspase 3 Schnitte wurden anschließend unter einem Mikroskop („Axioplan2 imaging“, Zeiss, DE) ausgewertet. Die auszuwertende Region war dabei das Stratum granulosum des Gyrus dentatus im Hippocampus der Ratte. Die Begutachtung der Schnitte erfolgte von rostral nach kaudal. Zuerst wurde, je Schnitt, die gesunde und anschließend die ischämische Hemisphäre ausgezählt. Da nur jeder dritte Schnitt für dieselbe Färbung vorgesehen war, wurde die abschließend gezählte Zellzahl mit dem Faktor drei multipliziert um eine Näherung für den gesamten Hippocampus zu erhalten. Die Auswertung der IBA1-gefärbten Schnitte erfolgte an einem anderen Mikroskop („BX 63“, Olympus, JPN). Mittels der Software cellSens Dimensions (Olympus, JPN) wurden auf eine Übersichtsaufnahme zu untersuchende Zielbereiche festgelegt, die sich über das komplette Striatum erstreckten. Diese Zielbereiche wurden dann fotografiert und in cellSens Dimensions (Olympus, JPN) ausgewertet.

Für die Auswertung von DCX, pH3 und Caspase 3 wurde ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung gewählt, für die Auswertung von IBA 1 eines mit 10-facher Vergrößerung. Als „leuchtend“ galt eine Zelle, die im Rotfilter heller als der Hintergrund leuchtete, aber im Grünfilter sich nicht vom Hintergrund unterschied. Je nach Färbung wurden die Kriterien entsprechend modifiziert:

Auswertung DCX

Im Falle von Doublecortin wurde jede leuchtende Zelle gezählt, die mindestens einen klar erkennbaren Fortsatz besaß und in der DAPI Färbung einen Zellkern vorwies. Das Soma musste sich entweder im Stratum granulosum befinden oder knapp darunter im Stratum subgranulosum. Im Zweifelsfall wurde die Zelle nicht gezählt. Zellen die in DAPI keinen Zellkern hatten, sowie Zellen mit außergewöhnlich großen Somata im Bereich des Hilums und Dendritenbäume ohne Somata, wurden ebenfalls nicht gezählt.

Auswertung pH3 und Caspase 3

Bei der pH3 Färbung und der aktiven Caspase 3 Färbung wurde jede leuchtende Zelle gezählt, die in DAPI einen Zellkern besaß und sich im Stratum granulosum oder Stratum subgranulosum (bzw. an der Grenze zum Stratum granulosum) befand. Im Falle von pH3 waren im

Soma manchmal kleine stärker leuchtende Punkte auszumachen, wohingegen die Caspase 3 positiven Zellen teilweise einen pyknotischen Kern zeigten.

Auswertung IBA1

Die Kameraaufnahmen („DP 80“, Olympus, JPN) erfolgten im CyTM3 Fluoreszenz-Fenster in Graustufen mit einer Belichtungsdauer von 222,2 Millisekunden (ms) und vierfacher Verstärkung in Z-Stacks, die von den jeweils unschärfsten Z-Ebenen in 5 µm Abständen vier bis acht Aufnahmen machten. Diese Aufnahmen wurden dann durch die Software zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Die insgesamt schärfste Ebene wurde zur Analyse herangezogen.

In der Software cellSens Dimension (Olympus, JPN) wurde die Funktion „Zählen und Messen“ ausgewählt. Um das Striatum wurde dann eine Polygon-Region of Interest (ROI) gelegt und, unter Verwendung eines Schwellenwertes (engl. *threshold*) im Histogramm von 3500-17000 (dimensionslos), jede Fläche größer als 25 Pixel automatisch bestimmt.

Als Referenz galt, für das jeweilige Gehirn, die nicht-ischämische kontralaterale Hemisphäre. Ein ähnliches Vorgehen mittels Selektion nach Zellgröße wurde bereits durch *Fernandez-Calle et al.* beschrieben (Fernandez-Calle et al. 2017).

Die gezählten Zellzahlen, Gewichte, Volumina und Flächen wurden in einer Microsoft Excel® (Microsoft, USA) Tabelle getrennt nach Färbung, Tiernummer, Objektträger, Schnitt und Hemisphäre festgehalten. Für Doublecortin, pH3, Aktive Caspase 3 und IBA-1 ergaben sich Stichprobenumfänge von $n = 3$ (siehe Tabelle 3-6).

3.4 (Mess-)Instrumente und Materialien

Geräte

Dreiweghahn „Discofix®-3“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Fluoreszenzlampe „LQ-HXP 120“	LEJ, Jena, DE
Fluoreszenzlampe „X-Cite 120PC“	Lumen Dynamics, Mississauga, CAN
Heizplatte	IKA, Staufen, DE
Hybridisierungsöfen „Pro Blot“	Labnet, Woodbridge, NJ USA
Kaltlichtquelle „KL 1500 electronic“	Zeiss, Jena, DE
Kamera „DP80“	Olympus, Tokio, JPN
Kreisschüttler	GFL, Burgwedel, DE
Laborwecker	Roth, Karlsruhe, DE
Mikroskop „Axioplan2 Imaging“	Zeiss, Jena, DE
Mikroskop „BX 63“	Olympus, Tokio, JPN
Mikrowelle	Clatronic, Kempten, DE
Objektträgerstrecktisch „OTS 40“	medite medizintechnik, Burgdorf, DE
pH-Meter „Lab 850“	SI Analytics, Mainz, DE
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Spritze 10 ml „BD Discardit®“	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Spritze 1 ml „Injekt®-F“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Thermostat	VWR, Darmstadt, DE
Vibratom „VT 1000S“	Leica, Nussloch, DE
Vortex Mixer „Genie 2“	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasseraufbereitungsanlage	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge „5415C“	Eppendorf, Hamburg, DE

Chemikalien

Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, DE
Agar Agar	Merck, Darmstadt, DE
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Ethanol	Roth, Karlsruhe, DE
Glycerin	Merck, Darmstadt, DE
Mowiol	Merck, Darmstadt, DE
Pferdeserum	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
Phosphat-gepufferte-Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, DE
Rinderserum	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
Triton X-100	SERVA, Heidelberg, DE
Ziegenserum	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
Zitronensäure	AppliChem, Darmstadt, DE

Primäre Antikörper

- Ziege (*goat*) anti Doublecortin (C-18): Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas TX, USA sc-8066
- Kaninchen (*rabbit*) anti p-Histone H3 (Ser 10)-R: sc-8656-R Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
- Kaninchen (*rabbit*) anti-active (cleaved form) Caspase 3: #AB3623 Millipore, Billerica, MA, USA
- Kaninchen (*rabbit*) anti ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1): #019-19741 Wako, Osaka, JPN

Sekundäre Antikörper

- biotinylated anti-Ziege (*goat*) IgG (H+L) Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
- CyTM3-conjugated AffiniPure Ziege Anti-Kaninchen (*goat Anti-rabbit*) IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA

- CyTM3-conjugated Streptavidin Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA

Verbrauchsmaterialien

Bügelklinge	Herkenrath, Solingen, DE
Deckgläser	Langenbrinck, Emmendingen, DE
Lipidstift „PAP Pen“	Daido Sangjo Co. Ltd., Tokio, JPN
Objektträger „SuperFrost Plus“	Langenbrinck, Emmendingen, DE
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Rasierklingen „Wilkinson Sword Classic“	Wilkinson Sword GmbH, Solingen, DE
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Reaktionsgefäße 15 ml	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Reaktionsgefäße 50 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Cyanoacrylkleber „Uhu Mini“	Uhu GmbH & Co KG, Bühl, DE
Transferpipetten	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
24- Wellplatte	Greiner, Frickenhusen DE
Puffer und Lösungen	
Agar 4%ig	2 g Agar Agar 50 ml PBS
Citratpuffer 10 mM	9 ml Zitronensäure 0,1M 41 ml Natriumcitrat 0,1M 450 ml Aqua dest. pH 6,0 einstellen
Eindeckmedium	10 g Mowiol 40 ml PBS 20 ml fluoreszenzfreies Glycerin
Natriumcitrat 0,1 M	29,41 g Natriumcitrat 1 l Aqua bidest.

Zitronensäure 0,1 M 21,01 g Zitronensäure
1 l Aqua bidest

Verwendete Software

Software	Verwendungszwecks	Hersteller
cellSens Dimension	Mikroskop und Bildbearbeitung	Olympus K.K., Tokio, JPN
Citavi 5.7.1.0 für Windows	Literaturverwaltung und Zitation	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH
Citavi 6.3.0.0 bis 6.7.0.0 für Windows	Literaturverwaltung und Zitation	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH
GraphPad Prism 5.01 für Windows	Statistische Auswertung	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
Microsoft® Office Excel 2007 (12.0.6787.5000) SP3 MSO (12.0.6785.5000) für Windows	Datenerhebung und Verarbeitung	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft® Office Word 2007 (12.0.6787.5000) SP3 MSO (12.0.6785.5000) für Windows	Textverarbeitung	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft® Paint für Microsoft Windows 10 Version 1803 (Build 17134.829)	Bildbearbeitung	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
PDF-XChange Viewer 2.5	PDF Darstellung	Tracker Software (Canada) Ltd, Chemainus, BC, CAN
PDF-XChange Editor 9.1	PDF Darstellung	Tracker Software (Canada) Ltd, Chemainus, BC, CAN

3.5 Statistische Auswertung

Die Messwerte jeder Hemisphäre eines Gehirns wurden, getrennt nach Färbung, arithmetisch gemittelt.

Der Vergleich der Testgruppen untereinander wurde mit Graphpad Prism 5 (Graphpad Software, Inc., USA) mittels einseitiger Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey's post hoc Test durchgeführt. Als statistischer Test wurde eine einseitige ANOVA gewählt, da es nur einen variablen Faktor (unbehandelt oder behandelt) an nur einem Messzeitpunkt gegeben hatte. Da kein interindividueller Vergleich von gesunden und ischämischen Hemisphären erfolgte, entfiel die Schädigung als zusätzlicher variabler Faktor.

4 Ergebnisse

Bei der gewählten Darstellung der Ergebnisse nach der Testung mittels einseitigem ANOVA ist zu beachten, dass nur Signifikanzen eingezeichnet wurden die entweder im Kriterium gleiche Gruppenzugehörigkeit (Kontrollgruppe, TXA301, TXA302) oder gleiche Hemisphäreneigenschaft (gesund, ischämisch) übereinstimmen. Signifikante Bezüge zwischen zum Beispiel der gesunden Hemisphäre einer Gruppe und der ischämischen Hemisphäre einer Anderen sind somit nicht dargestellt.

4.1 Volumenmessung

Für die Kontrollgruppe ergab sich bei $n=7$ ein Mittelwert von 0,72 ml (Standardabweichung (SD) 0,04 / Interquartilabstand (IQA) 0,07) auf der gesunden und von 0,60 ml (SD 0,04 / IQA 0,04) auf der ischämischen Hemisphäre. Für die Gruppe TXA301 bei einem Probenumfang von $n=10$ ein Mittelwert von 0,69 ml (SD 0,038 / IQA 0,07) für die gesunde und von 0,58 ml (SD 0,09 / IQA 0,17) für die ischämische Hemisphäre. Für die Gruppe TXA302 ergab sich mit $n=10$ ein Mittelwert von 0,72 ml (SD 0,03 / IQA 0,05) für die gesunde und von 0,62 ml (SD 0,10 / IQA 0,12) für die ischämische Hemisphäre. Im direkten Vergleich der Mittelwerte der Gruppen nahm die gesunde Hemisphäre ein größeres Volumen als die ischämische ein.

Es ergaben sich signifikante Unterschiede ($p<0,05$) der gesunden Hemisphäre der Kontrollgruppe gegenüber der ischämischen Hemisphäre derselben Gruppe. Darüber hinaus ergaben sich signifikante Unterschiede für die Gruppen TXA301 und TXA302 ($p<0,05$), jeweils für die gesunde und die ischämische Hemisphäre (siehe Diagramm 1). Die detaillierten Werte sind in Tabelle 1 aufgeführt. Generell ist das Volumen auf der ischämischen Seite gegenüber der gesunden reduziert. Es zeigte sich außerdem, dass die Mittelwerte der Hemisphären auch Gruppen übergreifend nahezu gleich sind.

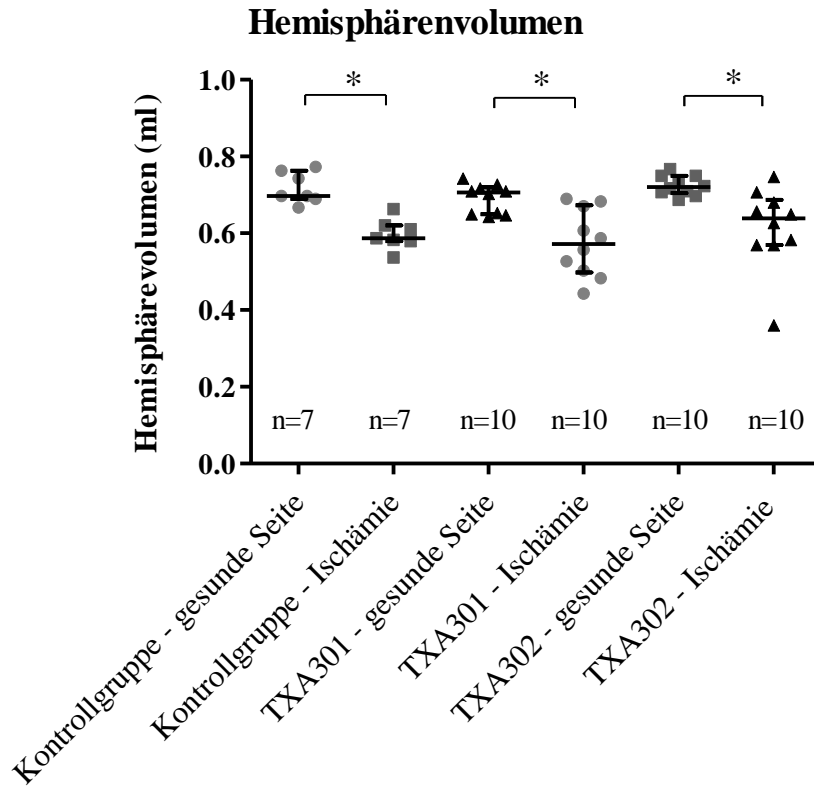


Diagramm 1 - Hemisphärenvolumen; einseitiger ANOVA a posteriori Tukey's multiple comparison test, Mediane mit Quartilen, $p < 0,05$ wurde mit einem * dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Volumina der gesunden Seite gegenüber der ischämischen Seite innerhalb einer Gruppe. Die Streuung innerhalb der Hemisphären war gering. Die Mediane der korrelierenden Hemisphären der jeweiligen Gruppen lagen ebenfalls auf ähnlichem Niveau.

Tabelle 1 - Hemisphärevolumen in Milliliter, Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQA) sowie der Stichprobenumfang n.

Volumen in Mililiter	Kontrollgruppe - DPBS		TXA301		TXA302	
	gesund	ischämisch	gesund	ischämisch	gesund	ischämisch
	0,77	0,58	0,70	0,50	0,69	0,57
	0,69	0,61	0,65	0,59	0,75	0,58
	0,70	0,54	0,65	0,69	0,70	0,66
	0,67	0,58	0,65	0,48	0,72	0,36
	0,74	0,62	0,71	0,56	0,75	0,75
	0,70	0,59	0,64	0,44	0,72	0,57
	0,76	0,66	0,71	0,61	0,71	0,68
			0,72	0,53	0,74	0,71
			0,73	0,68	0,77	0,63
			0,74	0,67	0,71	0,65
Mittelwert	0,72	0,60	0,69	0,58	0,72	0,62
SD	0,04	0,04	0,04	0,09	0,03	0,11
Median	0,70	0,59	0,71	0,57	0,72	0,64
IQA	0,07	0,04	0,07	0,17	0,05	0,12
n	7	7	10	10	10	10

4.2 Gewichtsbestimmung

Bei der Gewichtsbestimmung ergab sich für die Kontrollgruppe bei $n=7$ ein Mittelwert von 0,75 g (SD 0,05 / IQA 0,07) auf der Gesunden und von 0,62 g (SD 0,03 / IQA 0,07) auf der ischämischen Hemisphäre. Für die Gruppe TXA301 bei $n=10$ ergab sich ein Mittelwert von 0,72 g (SD 0,04 / IQA 0,08) auf der gesunden und von 0,59 g (SD 0,09 / IQA 0,17) auf der ischämischen Hemisphäre. Für die Gruppe TXA302 ergab sich ein Mittelwert von 0,75 g (SD 0,03 / IQA 0,03) für die gesunde und von 0,63 g (SD 0,10 / IQA 0,10) für die ischämische Hemisphäre.

Die Bestimmung des arithmetischen Mittels der einzelnen Gruppen zeigte auch hier, dass die gesunden Hemisphären in allen drei Gruppen schwerer waren als die ischämischen. Auch hier ergaben sich signifikante Unterschiede ($p<0,05$) für die gesunde Hemisphäre gegenüber der ischämischen in der Kontrollgruppe und der Gruppe TXA302, sowie einen signifikanten Unterschied ($p<0,05$) für die Gruppe TXA301 (in Diagramm 2 dargestellt). Die detaillierten Werte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

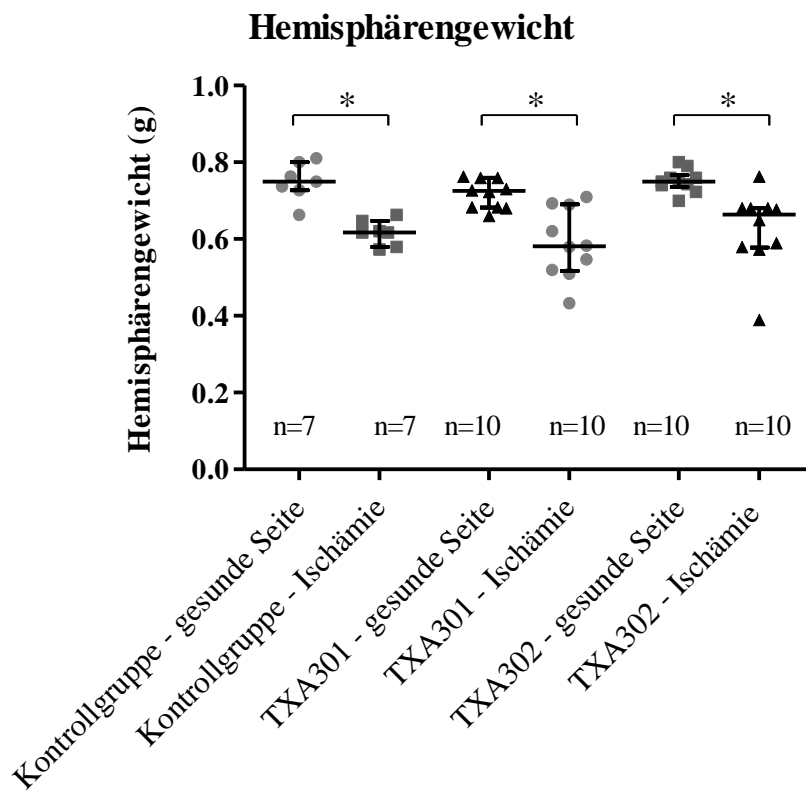


Diagramm 2 - Hemisphärenge­wicht; einseitiger ANOVA a posteriori Tukey's multiple comparison test, Mediane mit Quartilen, $p<0,05$ wurde mit einem * dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Gewichte der gesunden Seite gegenüber der ischämischen Seite innerhalb einer Gruppe. Die Streuung

innerhalb der Hemisphären war gering. Die Mediane der korrelierenden Hemisphären der jeweiligen Gruppen lagen ebenfalls auf ähnlichem Niveau.

Tabelle 2 - Gewicht der Hemisphären in Gramm, Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQA) sowie der Stichprobenumfang n.

Gewicht in Gramm	Kontrollgruppe - DPBS		TXA301		TXA302	
	gesund	ischämisch	gesund	ischämisch	gesund	ischämisch
	0,73	0,65	0,73	0,52	0,70	0,57
	0,75	0,57	0,68	0,58	0,76	0,58
	0,66	0,62	0,68	0,69	0,74	0,68
	0,76	0,62	0,68	0,51	0,76	0,39
	0,74	0,62	0,73	0,58	0,79	0,76
	0,80	0,66	0,66	0,43	0,74	0,59
	0,81	0,58	0,72	0,62	0,72	0,68
			0,76	0,55	0,75	0,68
			0,76	0,71	0,80	0,68
			0,76	0,69	0,75	0,65
Mittelwert	0,75	0,62	0,72	0,59	0,75	0,63
SD	0,05	0,03	0,04	0,09	0,03	0,10
Median	0,75	0,62	0,72	0,59	0,75	0,63
IQA	0,07	0,07	0,08	0,17	0,03	0,10
n	7	7	10	10	10	10

4.3 Phosphoryliertes Histon H3

Die Auswertung der pH3 Färbung ergab für die Kontrollgruppe mit n=3 einen Mittelwert von 1831 Zellen (SD 257 / IQA 513) auf der gesunden und von 1646 Zellen (SD 332 / IQA 144) auf der ischämischen Hemisphäre. Für die Gruppe TXA301 ergab sich ein Mittelwert von 87 Zellen (SD 78 / IQA 144) für die gesunde und von 98 Zellen (SD 107 / IQA 207) für die ischämische Hemisphäre. Für die Gruppe TXA302 ergab mit n=3 ein Mittelwert von 2575 Zellen (SD 1280 / IQA 2529) auf der gesunden und von 2617 (SD 1497 / IQA 2691) Zellen auf der ischämischen Hemisphäre.

Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den sich entsprechenden Hemisphären der Gruppen TXA301 und TXA302 (siehe Diagramm 3). Die detaillierten Werte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

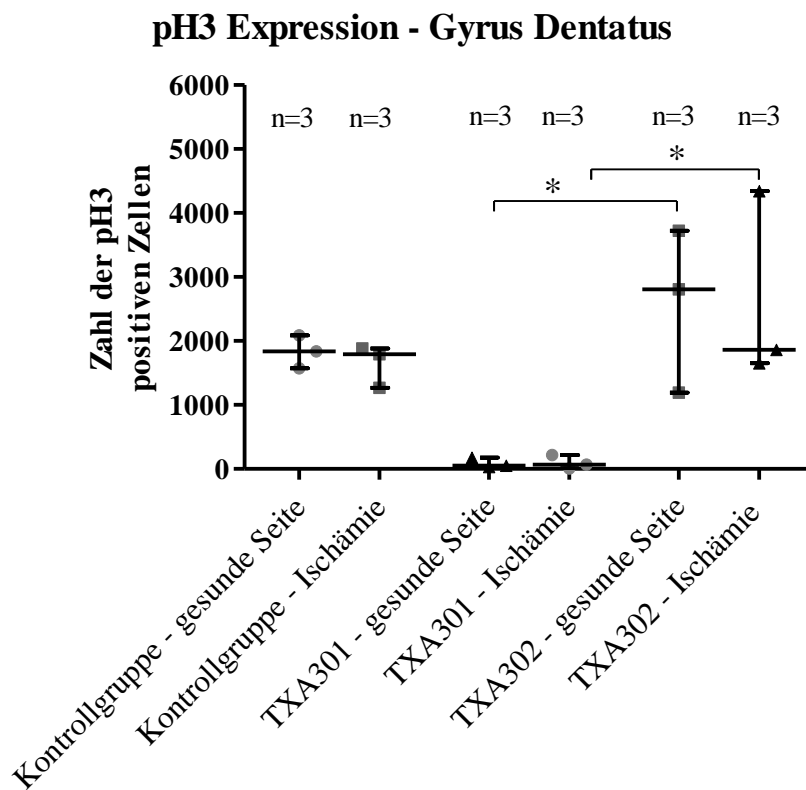


Diagramm 3 - Zahl der pH3 positiven Zellen im Gyrus dentatus; einseitiger ANOVA a posteriori Tukey's multiple comparison test, Mediane mit Quartilen, $p < 0,05$ wurde mit einem * dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Zellzahlen der gesunden und ischämischen Seiten der Gruppen TXA301 und TXA 302. Die Streuung innerhalb der Kontrollgruppe und TXA301 war gering. Die Mediane der korrelierenden Hemisphären innerhalb einer Gruppe (Kontrollgruppe und TXA301) lagen auf ähnlichem Niveau. TXA302 wies eine größere Streuung und auch interhemisphärisch unterschiedliche Mediane auf.

Tabelle 3 - Zahl der pH3 positiven Zellen je Hemisphäre, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQA) sowie der Stichprobenumfang n.

pH3 Zellzahlen	Kontrollgruppe - DPBS		TXA301		TXA302	
	gesund	ischämisch	gesund	ischämisch	gesund	ischämisch
	1572	1266	51	69	1194	1650
	1836	1881	33	9	2808	1860
	2115	1791	177	216	3723	4341
Mittelwert	1831	1646	87	98	2575	2617
SD	257	332	78	107	1280	1497
Median	1836	1791	51	69	2808	1860
IQA	513	615	144	207	2529	2691
n	3	3	3	3	3	3

4.4 Doublecortin

Es ergab sich für die Kontrollgruppe bei $n=3$ ein Mittelwert von 2848 Zellen (SD 304 / IQA 543) auf der gesunden und von 3659 Zellen (SD 1285 / IQA 2499) auf der ischämischen Hemisphäre. Für die Gruppe TXA301 mit $n=3$ ein Mittelwert von 4554 Zellen (SD 1735 / IQA 3207) auf der gesunden und von 3959 Zellen (SD 1632 / IQA 3195) auf der ischämischen Hemisphäre. Für die Gruppe TXA302 mit $n=3$ ein Mittelwert von 6570 Zellen (SD 420 / IQA 834) auf der Gesunden und von 6681 Zellen (SD 141 / IQA 252) auf der ischämischen Hemisphäre.

Es ergaben sich signifikante Unterschiede ($p<0,05$) zwischen den Zellzahlen der gesunden Hemisphäre der Gruppe TXA302 gegenüber der gesunden Hemisphäre der Kontrollgruppe (siehe Diagramm 4). Die detaillierten Werte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

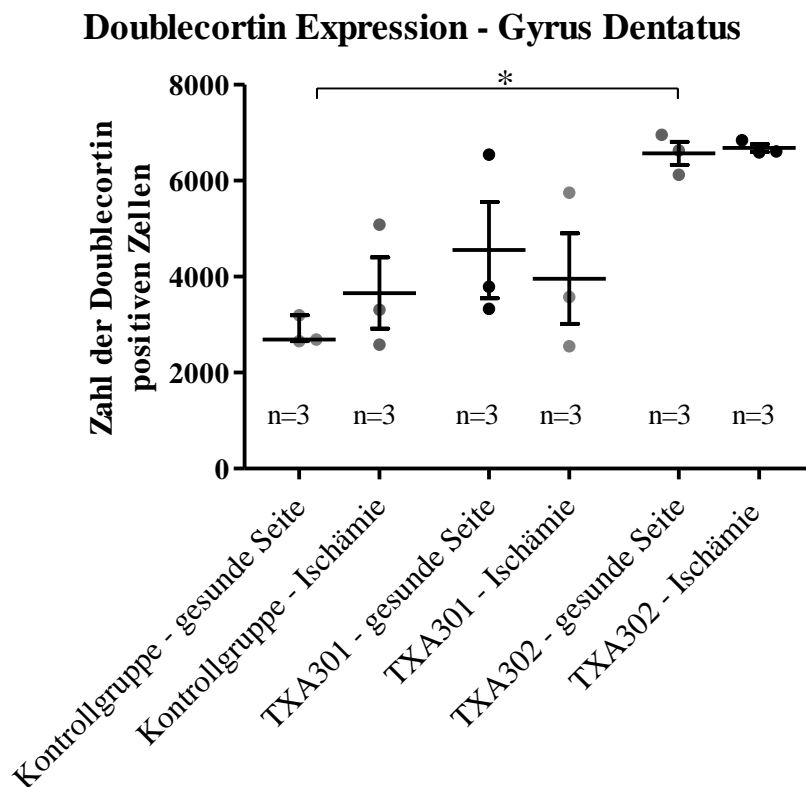


Diagramm 4 - Zahl der Doublecortin positiven Zellen im Gyrus dentatus; einseitiger ANOVA a posteriori Tukey's multiple comparison test, Mediane mit Quartilen, $p<0,05$ wurde mit einem * dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der gesunden Hemisphäre der Kontrollegruppe und der von TXA302. Die Mediane von TXA302 waren auf ähnlichem Niveau. Die der anderen Gruppen divergierten stark.

Tabelle 4 - Zahl der Doublecortin positiven Zellen je Hemisphäre, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQA) sowie der Stichprobenumfang n.

Double- cortin Zellzahlen	Kontrollgruppe - DPBS		TXA301		TXA302	
	gesund	ischämisch	gesund	ischämisch	gesund	ischämisch
	2691	5082	3789	3576	6123	6843
	3198	3312	6540	5748	6957	6591
	2655	2583	3333	2553	6630	6609
Mittelwert	2848	3659	4554	3959	6570	6681
SD	304	1285	1735	1632	420	141
Median	2691	3312	3789	3576	6630	6609
IQA	543	2499	3207	3195	834	252
n	3	3	3	3	3	3

4.5 Caspase 3

Die Auswertung der Caspase 3 Färbung ergab für die Kontrollgruppe mit n=3 einen Mittelwert von 515 Zellen (SD 24 / IQA 48) auf der gesunden und von 376 Zellen (SD 83 / IQA 165) auf der ischämischen Hemisphäre. Für die Gruppe TXA301 ergab sich mit n=3 ein Mittelwert von 1206 Zellen (SD 747 / IQA 1332) auf der gesunden und von 1314 Zellen (SD 904 / IQA 1656) auf der ischämischen Hemisphäre. Für die Gruppe TXA302 ergab sich mit n=3 ein Mittelwert von 303 Zellen (SD 137 / IQA 270) auf der gesunden und von 218 Zellen (SD 237 / IQA 450) auf der ischämischen Hemisphäre.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p \geq 0,05$) (siehe Diagramm 5). Die detaillierten Werte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

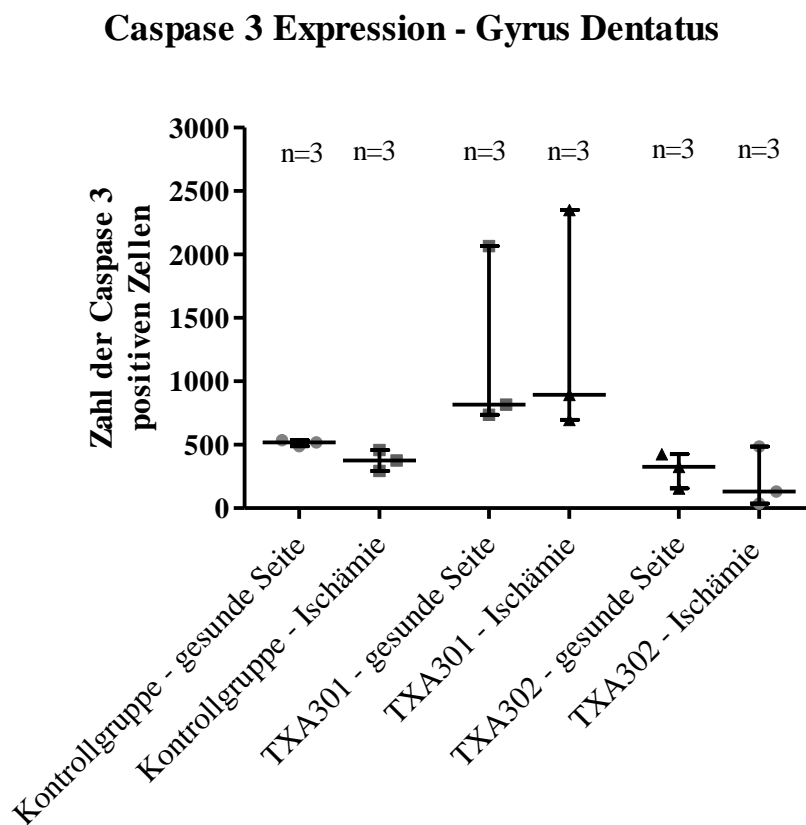


Diagramm 5 - Zahl der Caspase 3 positiven Zellen im Gyrus dentatus; einseitiger ANOVA a posteriori Tukey's multiple comparison test, Mediane mit Quartilen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Mediane der Kontrollgruppe und von TXA302 lagen auf ähnlichem Niveau. TXA301 wies eine größere Streuung auf.

Tabelle 5 - Zahl der Caspase 3 positiven Zellen je Hemisphäre, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQA) sowie der Stichprobenumfang n.

Caspase 3 Zellzahlen	Kontrollgruppe - DPBS		TXA301		TXA302	
	gesund	ischämisch	gesund	ischämisch	gesund	ischämisch
	519	459	735	894	426	486
	537	375	816	696	156	132
	489	294	2067	2352	327	36
Mittelwert	515	376	1206	1314	303	218
SD	24	83	747	904	137	237
Median	519	375	816	894	327	132
IQA	48	165	1332	1656	270	450
n	3	3	3	3	3	3

4.6 Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül-1

Für die bedeckte Fläche ergaben sich für die Kontrollgruppe Mittelwerte von 6,47% (SD 1,88 / IQA 3,44) für die gesunde und von 15,70% (SD 5,56 / IQA 10,31) für die ischämische Hemisphäre. Die Gruppe TXA302 wies die bedeckte Fläche im Mittel 6,34% (SD 3,02 / IQA 6,02) für die gesunde und 17,40 % (SD 9,15 / IQA 16,73) für die ischämische Hemisphäre auf. Damit ergab sich eine Differenz an bedeckter Fläche zwischen ischämischer und gesunder Hemisphäre von 9,23% für die Kontrollgruppe und von 11,06% für die mit TXA302 behandelte Gruppe. Für die gesunden Hemisphären der TXA302 Gruppe im Bezug zur Kontrollgruppe ergab sich eine Differenz von -0,13%. Bei den ischämischen Hemisphären lag diese bei 1,70%.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p >= 0,05$) (siehe Diagramm 6). Die detaillierten Werte sind in Tabelle 6 aufgeführt.

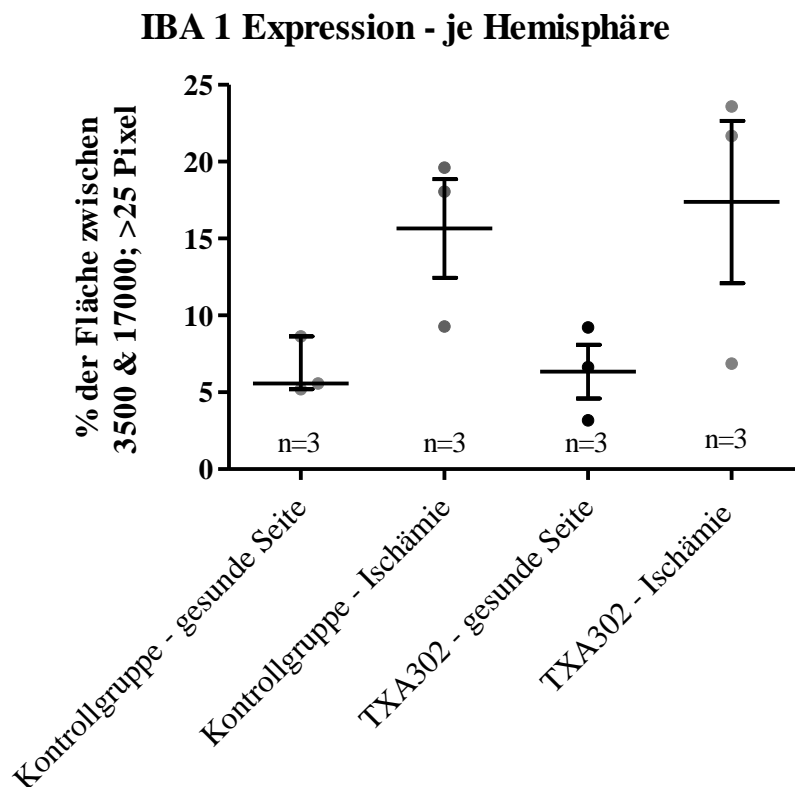


Diagramm 6 - Prozent der durch IBA 1 positiven Zellen bedeckten Fläche im Striatum; einseitiger ANOVA a posteriori Tukey's multiple comparison test, Mediane mit Quartilen. Die Auswertung erfolgte in cellSens Dimension (Olympus, JPN). Es wurde ein ROI mit der Funktion „Zählen und Messen“ ausgewählt und dann ein Schwellenwert im Histogramm zwischen 3500 und 17000 (dimensionslos) festgelegt. Weiterhin wurde definiert, dass nur Flächen größer als 25 Pixel zur Gesamtfläche hinzugezählt

wurden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Mediane der gesunden Hemisphären lagen auf ähnlichem Niveau.

Tabelle 6 – Mittelwerte aus den ausgewerteten Schnitten der mit IBA 1 positiven Zellen bedeckten Fläche, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IAQ), der Stichprobenumfang n sowie Differenzen der bedeckten Flächen der Hemisphären. Hierfür wurden die Mittelwerte der jeweils angegeben Hemisphären subtrahiert. Wobei im Falle „ischämisch-gesund“ die Subtraktion in derselben Gruppe stattfand, im Falle von „gesund-gesund“ und „ischämisch-ischämisch“ war die korrespondierende Hemisphäre der jeweils anderen Gruppe der Bezug. Es zeigte sich, dass der Unterschied innerhalb der Gruppe erheblich, aber ähnlich war. Im Vergleich mit der jeweils anderen Gruppenhemisphäre zeigte sich, dass das Ergebnis, im Falle der gesunden Hemisphären, nahezu identisch war.

Striatum % der bedeckten Fläche	Kontrollgruppe - DPBS		TXA302		Differenz der Mittelwerte	
	gesund	ischämisch	gesund	ischämisch	ischämisch-gesund Kontrollgruppe	TXA 302
	5,20	18,06	6,63	23,59	9,23	11,06
	8,64	19,61	3,19	6,87		
	5,58	9,29	9,21	21,67		
Mittelwert	6,47	15,70	6,34	17,40	gesund-gesund	-0,13
SD	1,88	5,56	3,02	9,15		
Median	5,58	18,1	6,63	21,7	ischämisch-ischämisch	
IAQ	3,44	10,31	6,02	16,73		1,70
n	3	3	3	3		

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Die gemessenen Volumina und Gewichte waren im Mittel über alle drei untersuchten Gruppen, sowohl für die gesunde, als auch die ischämische Hemisphäre, gleich groß. Eine Vergleichbarkeit ist damit gegeben. Die ischämische Hemisphäre war in allen drei Gruppen signifikant kleiner als die gesunde Hemisphäre (Diagramm 1 und Diagramm 2).

Die Zahl der sich in Mitose befindlichen Zellen der Gruppe TXA301 war signifikant niedriger gegenüber der Gruppe TXA302 (Diagramm 3). Von einem Einfluss durch Ang-(1-7) auf die Mitose kann ausgegangen werden.

Die Zahl der sich ausdifferenzierenden Neuronen in der ischämischen Hemisphäre der Gruppe TXA302 war signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die der Gruppe TXA301 waren ebenfalls leicht erhöht, allerdings nicht signifikant (Diagramm 4). Ein Einfluss von Ang-(1-7) auf die adulte Neurogenese ist, trotz unterschiedlicher Ergebnisse, anzunehmen. Ein Grund könnte z. B. eine unterschiedliche Ausdifferenzierungsgeschwindigkeit sein.

Die Zahl der in Apoptose befindlichen Zellen waren nicht signifikant verschieden gegenüber der Kontrollgruppe (Diagramm 5). Ein Einfluss kann mit den vorliegenden Daten nicht nachgewiesen werden.

Die Aktivität der Mikroglia war in der Gruppe TXA302 verglichen mit der Kontrollgruppe etwas, aber nicht signifikant erhöht (Diagramm 6). Eine Immunmodulation der Mikroglia durch Ang-(1-7) ist anzunehmen. Ein Einfluss auf die frühe Erholungsphase nach tMCAO ist, in der Zusammenschau mit der Literatur, wahrscheinlich.

Zusammenfassend konnte erstmals gezeigt werden, dass eine subkutane und nicht-intrathekale Applikation von Ang-(1-7) Einfluss auf die Zellteilung, die adulte Neurogenese und eine immunmodulatorische Wirkung hat. Dies steht im Einklang mit den durchgeführten Verhaltensversuchen, die eine schnellere Erholung nach tMCAO unter Therapie mit Ang-(1-7) feststellen konnten.

5.2 Bedeutung der Ergebnisse

Vergleichbarkeit der Gruppen

Die Ergebnisse der Gewichts- und Volumenbestimmung unterscheiden sich nicht wesentlich zwischen der Kontroll- und den behandelten Gruppen. Insofern ist eine Vergleichbarkeit des Probenmaterials gegeben. Zusätzlich zeigt dies auch, dass eine Behandlung mit den Ang-(1-7) Derivaten TXA301 und TXA302 keine Zunahme an Hirnmasse bewirkt. Dies wurde im Voraus als mögliche Erklärung des besseren Abschneidens in den Versuchen der Firma Pharmaseed Ltd. diskutiert (Krakovsky 2014). Demgegenüber beschreibt die Literatur in einigen Fällen eine Reduktion des Ischämiegebietes nach Ang-(1-7) Gabe (Bennion et al. 2015a, 2015b; Jiang et al. 2013; Mecca et al. 2011). Dies wird ebenfalls so nicht beobachtet. Allerdings muss eine ischämische Läsion nicht zwangsläufig auch zu einer Volumenreduktion führen, z. B. aufgrund von Zystenbildung oder Narbengewebe das den Defekt ausfüllt. Hierbei ist zu beachten, dass die klassische Volumetrie nicht in der Lage ist zuverlässig das Volumen von Ventrikel und nicht eröffneten Zysten zu bestimmen. Der Zu- und Abfluss in die bzw. aus den Ventrikeln oder Zysten vor der Messung kann nicht sichergestellt werden, ebenso wenig wie ein Zu- oder Abfluss während der Messung. Da zwischen den Messungen jedoch keine Luft in die Ventrikel und Zysten gelangen konnte um die Flüssigkeit abfließen zu lassen, ist davon auszugehen, dass die Ventrikel- und Zystenvolumina heraus gemittelt wurden, da sie in jeder Messung konstant waren.

Bei korrekter Durchführung der Methode kann angenommen werden, dass die Ventrikel keinen Schaden erlitten haben. Somit können diese in allen Gruppen zum Messzeitpunkt als ähnlich groß angenommen werden, tragen also nicht zu einer großen Schwankung des Gehirngewichtes bzw. -volumens bei.

Unter der Annahme, dass die Zysten ein Volumen von mehr als 40 Mikroliter nicht überschritten haben, sind auch diese zu vernachlässigen, da hier die Auflösungsgrenze bzw. der Standardfehler der Methode liegt.

Ferner zeigte sich kein signifikanter Unterschied der betroffenen Fläche in der IBA1 Färbung, sodass anzunehmen ist, dass das ischämische Areal ähnlich groß ist. Entsprechend ist eine Vergleichbarkeit des Ausgangsmaterials der unterschiedlichen Gruppen gegeben.

Da die behandelten Tiere aber trotzdem eine beschleunigte Erholung zeigten (Krakovsky 2014), ist fraglich, ob die Größe des Ischämiegebietes allein der Grund ist. Vielmehr scheint es, dass mehrere Faktoren, wie zum Beispiel Lokalisation, Ausmaß der Entzündungsreaktion und Möglichkeit der Regeneration und Kompensation die Prognose bzw. das Ergebnis bestimmen und ihre Beeinflussung in der Regenerationsphase eine Rolle spielen. Interessant

wäre hierbei zudem gewesen, wenn die Firma Pharmaseed Ltd. eine direkte Reperfusionbestimmung (z. B. per transkranieller Dopplersonographie) nach der tMCAO vorgenommen hätte, um diese in Relation zum vitalen Volumen bzw. dem Schaden zu setzen und so weitere Einflüsse auf die Regeneration zu ermitteln.

Unter Anderem beeinflusst die Mikrogliaaktivität die Reparatur des Gewebes (Taylor et Sansing 2013) und durch z. B. Interleukin-6 (IL-6) Sekretion die adulte Neurogenese (Kempermann et Neumann 2003). Ang-(1-7) führt, durch seine antagonistischen Effekte zu Ang II, zu einer NO Sekretion (Jiang et al. 2012; Mecca et al. 2011) und wirkt anti-inflammatorisch durch Hemmung von NF- κ B (Jiang et al. 2013). Um die Mikrogliaaktivität unter Einfluss von Ang-(1-7) zu untersuchen, wurde IBA 1 als immunhistochemischer Marker ausgewählt.

Die weiteren immunhistochemischen Färbungen des Ausgangsmaterials orientieren sich am Werdegang einer Zelle:

- Die Färbung des phosphorylierten Histons 3 (pH3) als Mitosemarker,
- Doublecortin (DCX) neuronaler Differenzierungsmarker und
- aktivierte Caspase 3 als Apoptosemarker

Phosphoryliertes Histon H3

Das phosphorylierte Histon H3 (pH3) als Teil des Histon Komplexes wird nur während der späten G2- und der M-Phase im Zellzyklus exprimiert (Dokter et von Bohlen und Halbach 2012; Hans et Dimitrov 2001; von Bohlen und Halbach 2011). Das heißt die Färbung, wie alle Mitosefärbungen, färbt unselektiv alle sich teilenden Zellen (Freund et al. 2013). Ein direkter Effekt durch die ischämische Schädigung oder durch die Substanzapplikation muss sich daher nicht unbedingt durch eine veränderte pH3 Zellzahl zum Messzeitpunkt darstellen. Zudem lag die letzte Substanzapplikation bereits ca. 20 Tage zurück. Als Alternative kommt die Ki-67 Färbung in Frage. Allerdings zeigen sich pyknotische Zellkerne in dieser Färbung, im Gegensatz zu pH3, positiv, da eine hypoxisch bedingte Ischämie zum Anstoßen der DNA Synthese in der Apoptose führen kann (von Bohlen und Halbach 2011). Entsprechend können durch die pH3 Färbung falsch positive Ergebnisse minimiert werden und sie ist daher, für die vorliegende Ausgangssituation des ischämischen Schlaganfalls, die bessere Wahl zur Färbung mitotischer Zellen.

Die drei Gruppen weisen erhebliche Unterschiede auf, die im Fall von TXA302 gegenüber TXA301 sogar signifikant sind (Diagramm 3).

Die Mittelwerte der pH3 positiven Zellen der TXA302 sind deutlich höher als die der anderen beiden Gruppen und die ischämische Hemisphäre weist mehr sich teilende Zellen auf als die gesunde Hemisphäre. Im Bezug auf die Kontrollgruppe ergibt sich der Schluss, dass die Gabe von TXA301 zu einer Verringerung der Zellteilung, wohingegen die Gabe von TXA302 zu einer vermehrten Zellteilung führt. Dieses Messergebnis erscheint zunächst ungewöhnlich, da die beiden Substanzen zu unterschiedlichen Effekten führen, obwohl beide Derivate des Ang-(1-7) sind. Es kann sich prinzipiell um Nebenwirkungen der Substanzen handeln. Dies würde erklären, warum es zu einer gegenläufigen Reaktion bei Applikation der beiden Substanzen kam. *Freund et al.* beschreiben 2013 aber eine Zunahme der pH3-Zellzahl bei MAS-Rezeptor Knockout Mäusen (*Freund et al.* 2013), deren Zellen also eine Stimulation durch Ang-(1-7) fehlt. Entsprechend ließe sich argumentieren, dass die Suppression durch die externe Ang-(1-7) Gabe nach Applikationsende wegfällt und nun eine kompensatorische Hyperproliferation einsetzt. Andererseits entsteht der anti-proliferative Effekt von Ang-(1-7), wenn auch auf Gefäßendothelzellen beschrieben, maßgeblich durch die antagonistische Wirkung zu Ang II (*Jiang et al.* 2013; *Zhang et al.* 2010). Somit ist die Beeinflussung der Zellteilungsrate durch die beiden Ang-(1-7) Derivate anzunehmen. Um sich hier sicher festlegen zu können wie diese Beeinflussung erfolgt, bräuchte es weitere Information über die Substanzen. Diese wurden durch Pharmaseed Ltd. nicht zur Verfügung gestellt.

Doublecortin

Die signifikant höhere Zahl der Doublecortin (DCX) positiven Zellen in der mit TXA302 behandelten Gruppe, lässt den Schluss zu, dass dieses Ang-(1-7) Derivat die adulte Neurogenese fördert (Diagramm 4). Allerdings lassen sich die verbesserten neurologischen Punktwerte (engl. *Neuroscore*) und das bessere Abschneiden bei den Verhaltensversuchen nicht allein auf diese Tatsache zurückführen: die mit TXA301 behandelte Gruppe schnitt, trotz deutlich geringerer Zahl an DCX positiven Zellen (Diagramm 4), in den Verhaltensversuchen und den neurologischen Punktwerte ähnlich niedrig wie TXA302 und signifikant verschieden gegenüber der Kontrollgruppe ab (*Krakovsky* 2014). Trotzdem könnte die signifikant höhere DCX Zahl der mit TXA302 behandelten Tiere, gegenüber der Kontrollgruppe, für eine Assoziation mit der Substanz sprechen, da sowohl die

neurologischen Punktwerte als auch die DCX Zellzahlen sich gleichermaßen entwickeln (Krakovsky 2014). Zwar entfaltet Ang-(1-7) eine anti-proliferative Wirkung an glatten Muskelzellen (Jiang et al. 2013) aber, wie bereits im Absatz zu pH3 erwähnt, hat es auch Einfluss auf die adulte Neurogenese im Hippocampus (Freund et al. 2013). Andererseits ist es Higaki et al. 2018 nicht gelungen einen signifikanten Unterschied an DCX positiven Zellen in MAS-Knockout Mäusen nachzuweisen (Higaki et al. 2018), wobei diese Mäuse in kognitiven Tests auch nicht schlechter abschnitten als ihre Artgenossen. Offensichtlich korrelieren die kognitiven Tests in diesem Fall nicht mit den gemessenen DCX Zahlen. Eine eindeutige Zuordnung der DCX Zahl zu den neurologischen Punktwerten kann mit diesen Daten leider nicht erbracht werden, da nur ein einziger Messzeitpunkt, *post mortem*, vorliegt.

Hinsichtlich des Einflusses von Ang-(1-7) auf die adulte Neurogenese ergeben sich im Wesentlichen folgende Hypothesen:

1. Die adulte Neurogenese könnte durch TXA301 und TXA302 unterschiedlich stark, schnell oder langanhaltend aktiviert werden und nun deswegen zum Messzeitpunkt noch solch hohe DCX Zellzahlen aufweisen. So könnte der Effekt von TXA302 langanhaltender oder vielleicht sogar verspätet einsetzen. Gegen die Verspätung spricht der zeitlich beobachtbare, ähnlich gute neurologische Punktwert wie TXA301 (Krakovsky 2014), der unter der Annahme, dass er von der DCX Zellzahl abhängig ist, dann nicht zu beobachten wäre, wenn die Wirkung verspätet einsetzen würde.
2. Wenn hingegen beide Substanzen verspätet in ihrer Wirkung einsetzen, dann ist der anfängliche Effekt eher mit einer Immunmodulation zu erklären (Luo J et al. 2014) und erst der langfristige Effekt, d. h. die gemessene Zellzahl, durch die Substanzwirkung an den zerebralen Zellen.
3. In mehreren Studien wurde beschrieben, dass eine wesentliche Wirkung von Ang-(1-7) nach einem Schlaganfall die Verminderung der Entzündungsreaktion durch antagonistische Wirkweise zu Ang II ist (Jiang et al. 2012; Regenhardt et al. 2013). Dieser Effekt wird sicherlich auch hier beobachtbar sein. Wenn nun die positiv neurogenetische Wirkung der Substanzen verzögert einsetzt, wovon aufgrund der Kaskaden und intrazellulären Vorgänge auszugehen ist, dann könnte die jetzt beobachtbare Zahl durchaus eine direkte Substanzwirkung darstellen. Insbesondere wenn man bedenkt, dass erst ein Wirkspiegel im Zielgebiet aufgebaut werden und die Zellen ihren Stoffwechsel anpassen mussten. Im Umkehrschluss heißt diese Annahme allerdings ebenfalls, dass die initial beobachtete schnellere Regeneration, im Sinne eines besseren neurologischen

Punktwertes, nicht auf eine vermehrte adulte Neurogenese zurückgeführt werden kann. Entsprechend den Ergebnissen von *Luo et al.* aus 2014 und *Higaki et al.* aus 2018 (Higaki et al. 2018; Luo J et al. 2014).

4. Denkbar wäre außerdem, dass Neurone unter TXA301 deutlich schneller zu adulten Neuronen ausreifen. Ausgereifte Neurone verlieren DCX als Marker (von Bohlen und Halbach 2011) und Marker adulter Neurone zum Beispiel NeuN wurden nicht untersucht. Diese Hypothese erklärt auch den besseren neurologischen Punktwert bei gleichzeitig niedrigeren DCX positiven Zellzahlen zum Messzeitpunkt.

Zusammenfassend kann der neurologische Punktwert ein gewisser Prädiktor für eine Veränderung DCX positiven Zellen sein und Ang-(1-7) hat offensichtlich eine Wirkung auf die adulte Neurogenese, sei es durch Zu- oder Abnahme der DCX positiven Zellen.

Caspase 3

Apoptose und Nekrose werden beide durch eine länger bestehende Ischämie ausgelöst (Allen et Bayraktutan 2009; Benchoua et al. 2001; Hyman et Yuan 2012; Onténiente et al. 2003; Wang et al. 2015). Je nachdem wie geordnet der Prozess vonstattengeht, maßgeblich bestimmt durch den verbliebenen Energiegehalt der Zelle, lassen sich morphologisch eher Zeichen der Apoptose oder der Nekrose nachweisen (Benchoua et al. 2001; Nicotera et al. 1998; Onténiente et al. 2003). Die Schädigung der Zellen entsteht zum einen aufgrund des Sauerstoffmangels und den dadurch entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies, zum anderen auch als Begleitreaktion der Entzündung, dann ausgelöst durch die Aktivität der Immunzellen, also Mikroglia und Makrophagen, die durch proteolytische Enzyme die Entzündung unterhalten (Allen et Bayraktutan 2009; Jiang et al. 2013; Onténiente et al. 2003).

Zum Messzeitpunkt lag wieder eine geregelte Sauerstoffversorgung vor. Entsprechend ist davon auszugehen, dass aufgrund des langen Zeitraumes zwischen Interventions- und Messzeitpunkt der Großteil der Caspase 3 positiven Zellen sich zum Messzeitpunkt in Apoptose befand.

Betrachtet man die Kontrollgruppe als Norm, so induziert die Gabe von TXA301 eine vermehrte Apoptose, wohingegen die Gabe von TXA302 die Apoptoserate leicht senkt (Diagramm 5).

Da Caspase 3 ein unspezifischer Marker hinsichtlich unterschiedlicher Zellreihen ist (Onténiente et al. 2003), lassen sich die Ergebnisse alleine nicht direkt auf die Hauptfragestellung beziehen. So könnten auch andere Zellreihen (z. B. Gliazellen) vermehrt oder

vermindert in Apoptose gegangen sein. Hinsichtlich der Markierung in Apoptose befindlicher Zellen ist Caspase 3 als Effektorcaspase jedoch hoch spezifisch (Benchoua et al. 2001; Onténiente et al. 2003).

Zum Messzeitpunkt ist eine Auswirkung der räumlich nahen Entzündung nicht sicher auszuschließen, wobei die Kontrollgruppe ebenfalls diesem Stimulus ausgesetzt war und nicht alle Zellreihen gleichsinnig auf die Stimuli der Entzündung reagieren. Würde ein Einfluss durch die Entzündung vorliegen, wären zwar alle drei untersuchten Gruppen gleichermaßen betroffen, eine Modulation durch die verabreichten Substanzen ist aber denkbar. Insbesondere in der Zusammenschau mit den Ergebnissen der IBA1 Färbung (siehe unten). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Wang et al. aus 2015. Sie konnten bis zu sieben Tage nach MCAO, gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe, erhöhte Caspase 3 Konzentrationen im Blut messen (Wang et al. 2015). Somit wäre nach mehr als sieben Tagen eine normalisierte Caspase 3 Konzentration zu erwarten. Zwar schreiben sie, dass sich nach sieben Tagen der Wert wieder an die Ausgangskonzentration angeglichen hat, ihre Tabelle III zeigt aber einen deutlich erhöhten Caspase 3 Wert in der MCAO Gruppe bezogen auf die anderen beiden Gruppen, auch noch nach sieben Tagen. Zudem wurden in der hier vorliegenden Arbeit keine Konzentrationen gemessen, sondern Zellen die dieses Protein in aktivierter Form in sich tragen. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Kontrollgruppe dieser Arbeit wäre, bei Korrelation von Zellzahl und Konzentration, allerdings möglich, lediglich der Messzeitpunkt ist ein anderer. Ferner beschrieben Chen et al. bereits 1998 einen Caspase 3 Gipfel um 72 Stunden nach einem ischämischen Ereignis (Chen et al. 1998).

Ein direkter Einfluss von Ang-(1-7) auf die Apoptoseachse bzw. Effektorcaspasen im Gehirn ist bisher so nicht in der Literatur beschrieben. Ein indirekter Einfluss durch die immunmodulatorische Wirkung und der damit verbundenen verringerten Entzündungsreaktion ist zum Beispiel durch Jiang et al. 2013 beschrieben (Jiang et al. 2013). Tsai et al. konnten 2018 einen Einfluss von Ang-(1-7) auf die Caspase 3 Expression von Leberzellen beobachten (Tsai et al. 2018). Auch Bennion et al. beschreiben 2015 eine Reduktion des oxidativen Stresses durch Ang-(1-7) (Bennion et al. 2015a). Eine Veränderung des oxidativen Stresses und eine Immunmodulation scheinen insofern nicht abwegig und werden im Verlauf des Versuches stattgefunden haben. In der einmaligen Endpunktmessung dieser Arbeit zeigt sich keine Auswirkung von Ang-(1-7) auf die Apoptoserate.

Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül 1 (IBA 1)

Die IBA 1 Untersuchung beschränkte sich, aufgrund des stark limitierten Ausgangsmaterials, auf die in einer Zwischenanalyse als interessante Subgruppe aufgefallene Untergruppe TXA302 und die Kontrollgruppe.

Die nicht signifikante Veränderung der Mikroglia Zellzahl ist zunächst kritisch zu betrachten, da es in beiden Gruppen Ausreißer-Werte gibt. Je nach Argumentationsstandpunkt sind entweder ein Ausreißer-Wert oder die anderen beiden Werte als Ausreißer-Werte denkbar. Aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs von $n=3$ ist diese Unterscheidung nicht eindeutig zu treffen. Für die weitere Argumentation wurde ein Ausreißer-Wert angenommen und entsprechend von einer initialen Mehraktivität ausgegangen.

Mikroglia lassen sich in zwei Populationen einteilen:

1. M1 Mikroglia mit proinflammatorischer Zytokinesekretion
2. M2 Mikroglia mit Reparaturfunktion und schützender Funktion (Taylor et Sansing 2013).

Wie Neurone exprimieren auch Mikrogliazellen, wie alle Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (MPS), den MAS Rezeptor (Mecca et al. 2011). Eine Ang-(1-7) Wirkung ist somit möglich und auch bereits beschrieben (Regenhardt et al. 2013, 2014b). Die anti-inflammatorische Wirkung beruht wahrscheinlich auf der Modulation der NF- κ B und TNF- α Kaskade (Arroja et al. 2016; Jiang et al. 2012; Regenhardt et al. 2013, 2014a). *Jiang et al.* argumentieren 2012, dass Ang-(1-7) zu einer verminderten Expression und veränderten Phosphorylierung von NF- κ B und damit zu einer geringeren Translokation in den Zellkern führt (Jiang et al. 2012). Zudem wird eine Begünstigung der adulten Neurogenese z. B. im Hippocampus diskutiert, die eventuell durch die Modulation der IL-6 Sekretion erreicht wird (Arroja et al. 2016; Kempermann et Neumann 2003; Kokaia et al. 2012). *Kempermann et al.* beschreiben 2003, dass unter vermehrter IL-6 Exposition sich entweder neuronale Stammzellen vermehrt zu Astrozyten und weniger zu Neuronen differenzieren oder neuronale Progenitorzellen vermehrt in Apoptose getrieben werden (Kempermann et Neumann 2003). *Kokaia et al.* verknüpfen 2012 IL-6 mit einem Absinken der Proliferationsrate (Kokaia et al. 2012). Eine verminderte IL-6 Exposition könnte insofern einen gegenteiligen Effekt haben oder zumindest das Proliferationsgleichgewicht bzw. Niveau auf die Norm anheben (Kokaia et al. 2012).

Die Mikroglia Modulation könnte eine Erklärung für die schnellen Erholungseffekte der ersten Tage bieten (Luo J et al. 2014) (siehe auch DCX Hypothese 2). So finden sich bei einer

tMCAO bzw. einem ischämischen Schlaganfall 24 bis 48 Stunden morphologisch und damit aktivierte Mikroglia im Infarktkern (Taylor et Sansing 2013). Sofern sich diese unter Einfluss von Ang-(1-7) vermehrt zur M2 Subpopulation entwickeln würden, wäre der Schaden kleiner und die Reparaturfunktion würde überwiegen. Diese Mikroglia bleiben auch über mehrere Tage bis zu vier Wochen aktiv (Gong et al. 2000; Jenkins et al. 1989; Taylor et Sansing 2013). Auch im Rahmen eines hämorrhagischen Schlaganfalles wurden noch nach einem Monat Mikroglia-Aktivität beobachtet (Regenhardt et al. 2014a). Trotzdem ist davon auszugehen, dass die beobachteten Effekte nach Tag 29, also die Verbesserung der motorischen und sensorischen Leistung (in den Tests „Platzieren der Vorderpfoten“ und „Schwingtest“) (Krakovsky 2014), nicht allein durch Mikroglia vermittelte Effekte erzeugt werden.

In der mit TXA302 behandelten Gruppe wurde eine größere mit Mikroglia bedeckte Fläche in der ischämischen Hemisphäre beobachtet (Diagramm 6). Dies kann verschiedene Gründe haben:

1. Es könnte eine verminderte M1 Mikroglia Aktivierung bzw. Differenzierung und somit eine verminderte bzw. modulierte Entzündungsreaktion stattgefunden haben. Dies scheint aber angesichts der Ergebnisse der oben genannten Arbeiten unwahrscheinlich.
2. Ang-(1-7) könnte in der Initialphase zu einer Mikroglia Suppression der M1 Mikroglia führen bzw. die Differenzierung von nativen Mikroglia hin zu den Subtypen M1 (und M2) hemmen. Dadurch würde es zu einer verminderten proinflammatorischen Zytokin Ausschüttung und somit zu einer geringeren Entzündungsreaktion kommen (Hu et al. 2012).
3. *Kempermann und Neumann* haben 2003 die Tatsache angesprochen, dass Mikroglia nicht unerheblich an der Sekretion von BDNF und damit an der Entstehung eines entsprechenden Zytokin Milieus, beteiligt sind (Kempermann et Neumann 2003).

BDNF als stimulierender Faktor ist für eine neuronale Integration und Reorganisation, insbesondere für das Langzeitüberleben, essentiell wichtig, was auch weitere andere Gruppen zeigen konnten (Begni et al. 2017; Bellenchi et al. 2013; Christie et Turnley 2012; Lee et al. 2002; Parent et al. 2002; Sairanen et al. 2005). Sowohl *Christie et al.* 2012 als auch *Schwengel et al.* 2016 haben eine erhöhte BDNF Konzentration nach ischämischen Ereignissen beschrieben, die wiederum zu einem verbesserten Outcome führte (Christie et Turnley 2012; Schwengel et al. 2016).

Der Kollateralschaden wäre, gemäß These 2, weniger ausgeprägt, denn Neurone könnten sich schneller regenerieren und das neurologische Defizit fiel kleiner aus. Ein Wegfall

der (in dieser Hypothese) Mikroglia-suppressiven Substanz TXA302 ab Tag 30 könnte eine (geordnete) Reorganisationsreaktion durch Mikroglia angestoßen haben. In der Kontrollgruppe fehlte diese supprimierende Wirkung und entsprechend wäre die Mikroglia Aktivität ab Tag 30 geringer, da der Reorganisationsvorgang inzwischen fast abgeschlossen wäre und es also nicht zu einer kompensatorischen Überaktivierung kommen würde. Entsprechend ließe sich die geringere Mikroglia Fläche in der Kontrollgruppe erklären.

Dieser Sachverhalt wurde durch *Szalay et al.* 2016 weiter untersucht (Szalay et al. 2016): sie beschreiben zwar einerseits eine verbesserte neuronale Regeneration unter M2 und naiven Mikroglia, andererseits führte eine Mikroglia Depletion (und so auch eine zu intensive Suppression) zu einem größeren ischämischen Schaden (Szalay et al. 2016). Weiterhin beschreiben sie, dass die Depletion drei Wochen benötigte bzw. 21 Tage nach Ende der Suppression die Mikroglipopulation wieder (nahezu) vollständig regeneriert war (Szalay et al. 2016). Analog dazu würden die Beobachtungen passen, dass 21 Tage nach Ende der Applikation von TXA302, vermehrt Mikroglia Aktivität und eine vermehrte Zahl an Caspase 3 positiven Zellen gemessen werden konnten. Unerklärbar wären dann noch die verbesserten Ergebnisse im vorangegangenen Tierversuch, da diese dann mit größerem ischämischen Schaden entstanden wären. Dies scheint kontraintuitiv und widerspricht der klinischen Erfahrung (Alqahtani et al. 2017; Bruno et al. 2013; Lee et al. 2012). Dem gegenüber beschreiben *Regenhardt et al.* eine verminderte Zahl an Mikroglia nach intrathekaler Applikation von Ang-(1-7) (Regenhardt et al. 2014b).

In diesem Zusammenhang wäre denkbar, dass die Substanz TXA302 eine Mikroglia-stimulierende Wirkung besitzt die besonders langanhaltend ist und daher jetzt noch eine größere Zahl Mikroglia aktiv ist. Dagegen spricht, dass die nicht-ischämische Hemisphäre keine erhöhte Mikroglia-Aktivität aufweist, wobei *Szalay et al.* 2016 ähnliche Beobachtungen machten (Szalay et al. 2016).

Bezogen auf die oben dargestellten Ergebnisse, bestärken die beobachteten Ergebnisse das Argument von These 3, dass durch eine Stimulation der M2 Mikroglia die BDNF Sekretion angestoßen bzw. aufrechterhalten wurde und dadurch ein Milieu entstanden ist, dass eine bessere Integration und ein besseres Überleben bei gleichzeitig geringerem Kollateralschaden der neu gebildeten Neurone begünstigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen: eine vermehrte Mikroglia Aktivität nach TXA302 Applikation konnte gemessen werden (Diagramm 6). Damit ist ein Einfluss von Ang-(1-7) zu vermuten, zumal dieser bereits in der Literatur beschrieben wurde (Regenhardt et al. 2013, 2014b). Die oben diskutierte Überlegung hinsichtlich der vermehrten Differenzierung hin zu M2 Mikroglia und/oder verminderten M1 Mikroglia Zahl lässt sich durch die gemessenen Flächen und dem im Vorversuch gemessenen besseren Abschneiden im Verhaltensversuch in Einklang bringen, sodass ein Einfluss von Ang-(1-7) auch in dieser Achse logisch erscheint. Weiterhin könnten diese Auswirkungen BDNF vermittelt sein.

5.3 Stärken und Schwächen der Arbeit

Gewichts- und Volumenbestimmung

Die gemessenen Gewichte und Volumina zeigen, dass die ausgewerteten Gehirne über alle Gruppen hinweg sehr einheitlich waren. Die untersuchten Gehirne weisen also alle eine ähnlich große Schädigung auf. Dadurch ist die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen sichergestellt.

Die hier verwendete Methode zur Volumenbestimmung wurde eigens für diese Arbeit etabliert (inspiriert durch (Douglass et Wcislo 2010)). Grund hierfür war, dass andere Methoden die in Erwägung gezogen wurden, sich als nicht praktikabel erwiesen. Da die Gehirne bereits beim Erhalt in PFA fixiert waren, erwies sich die in anderen Arbeiten sehr häufig bis standardgemäß verwendete 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid Färbung als nicht möglich (Hossmann 2008; Jiang et al. 2012; Mecca et al. 2011; Regenhardt et al. 2013; Wang et al. 2015). Eine Auswertung mittels Kleintier-CT wurde mit der Prämisse, dass PFA fixiertes Gewebe eine eingeschränkte Auflösung bietet, verworfen. Zudem bestand keine Erfahrung in der Auswertung von computertomographischen Bildern des Gehirns nach einem länger zurückliegenden Schlaganfall. Diese stellt sich als nicht trivial dar, was unter anderem an Phänomenen wie dem sogenannten „Fogging“ liegt (Becker et al. 1979). Ein Zugang zu einem Kleintier-MRT wie er in anderen Arbeiten verwendet wurde (Hossmann 2008; Schwengel et al. 2016), bestand nicht. Die hier verwendete Methode lässt sich an PFA fixiertem Gewebe problemlos durchführen, sie ist relativ schnell und kostengünstig.

Um die Messung möglichst präzise bei kleinen Volumina zu gestalten, wurde das System mit dem Drei-Wege-Hahn und den beiden 1 ml Spritzen gewählt. Die Methode besitzt den Nachteil, dass das ermittelte Volumen abhängig von Untersucher, Erfahrung und Ablesbarkeit ist. Durch das mehrmalige Auf- und Abbewegen des Spritzenstempels wurde der Meniskus möglichst klein gehalten und damit die Ablesegenauigkeit erhöht. Weiterhin gibt es keine Möglichkeit etwaige (Pseudo-)Zysten, Kavernen oder die Ventrikel sicher zu entleeren um diese Volumina herauszurechnen. Ferner erfolgte der Schnitt zur Halbierung der Hemisphären nach Augenmaß. Eine Deviation zur ein oder anderen Hemisphäre ist nicht auszuschließen. Trotzdem zeigten die Messergebnisse, dass eine relativ hohe Konstanz der gesunden Hemisphären besteht. Dies kann darauf hinweisen, dass der Hemisphären-Halbierungs-Schritt exakt durchgeführt wurde und sich im Rahmen des Standardmessfehlers befindet.

Die von *Douglass et. al* 2010 angesprochene Vermeidung von Schrumpfungartefakten, zum Beispiel bei histologischen Methoden (Douglass et Wcislo 2010), gilt beim verwendeten Probenmaterial nur bedingt. Die weitere Schrumpfung des Gewebes durch histologische Methoden bleibt sicherlich aus, allerdings ist bereits durch die Fixierung durch PFA eine Schrumpfung eingetreten. Das ursprüngliche Volumen wird etwas größer gewesen sein als das gemessene (Fox et al. 1985). Für diese Arbeit ist das Ursprungsvolumen aber nur von untergeordneter Bedeutung, da sich alle Proben in diesem Zustand befanden. Eine Extrapolation wäre möglich, hätte aber für die Fragestellung keine Konsequenz. Auf die Hinzugabe von Alkohol zur Reduktion der Oberflächenspannung (Douglass et Wcislo 2010) wurde, um die histologischen Färbungen nicht zu beeinflussen, verzichtet.

Die Gewichtsbestimmung wurde zusätzlich als Kontrolle zur neuen Methode der Volumenbestimmung mit durchgeführt. Die Fehlerquellen und Problemfelder sind identisch zu denen der Volumenbestimmung.

Immunhistologische Methoden

Die immunhistologischen Methoden haben im Allgemeinen den Vorteil sehr spezifisch zu sein. Allerdings schwankt die Qualität abhängig vom verwendeten Antikörper (Kim et al. 2016). Zudem können schon kleine Änderungen, wie zum Beispiel das Verwenden anderer Blockierseren, die Qualität des Ergebnisses deutlich beeinflussen. Im Falle beispielsweise der Seren könnte der Hintergrund deutlich stärker hervor treten (sog. Rauschen) und dadurch die Färbung schwerer zu analysieren sein (Kim et al. 2016). Unter Umständen können sie auch Bindungsstellen des primären Antikörpers verlegen oder Zielproteine denaturieren und dadurch die Spezifität senken (Kim et al. 2016). Insbesondere das Protokoll, die Routine der durchführenden Person sowie die Qualität des Ausgangsgewebes sind wesentliche Einflussfaktoren. Diesbezüglich zeigte sich, dass die Perfusion nach der Euthanasie nicht in jeder Probe gleich gut erfolgt war. Teilweise fielen, wenn auch hauptsächlich cortextnah, viele erythrozytengefüllte Blutgefäße auf, die deutlich fluoreszierten.

Phosphoryliertes-Histon H3 Färbung

Aufgrund der Eigenschaft der pH3-Färbung jede sich teilende Zelle anzufärben, kann nicht unterschieden werden welche Zellen sich schlussendlich zu Neuronen differenzieren werden.

Entsprechend ist eine genaue Zuordnung von pH3 positiven Zellen zu DCX positiven Zellen mit den erhobenen Daten nicht möglich. Mittels sehr aufwendigen Doppelfärbungen wäre dies theoretisch möglich. Im Anbetracht des Expressionszeitraumes im Zellzyklus stellt sich allerdings die Frage inwieweit eine solche Doppelfärbung sinnvoll gewesen wäre, da mitotische Zellen normalerweise kein DCX exprimieren (von Bohlen und Halbach 2007, 2011). Aufgrund der geringen Probenzahl stand wenig Material zur Etablierung der Färbungen zur Verfügung, sodass der Schwerpunkt auf Qualität bzw. Zuverlässigkeit der Einzelfärbungen statt auf Etablierung einer Doppelfärbung gelegt wurde.

Außerdem stellten sich die pH3 positiven Zellen in dem hier gefärbten Rattengewebe deutlich schwächer dar, als zum Beispiel im Maus Gewebe. Dies lag hauptsächlich am höheren Hintergrund, bedingt unter anderem durch die Qualität des Ausgangsgewebes.

Hinsichtlich der untersuchten Region im Bezug auf die pH3 Färbung ist zu erwähnen, dass zwar nur Zellen im Stratum subgranulosum und granulosum gezählt wurden, die relativ spezifisch für Progenitorzellen und sich differenzierende Neurone sind, eine Veränderung der Stützzellzahl, zum Beispiel der Astroglia, wurde nicht untersucht und damit ist eine Verfälschung nicht auszuschließen.

Erwähnenswert ist außerdem, dass die pH3-Färbung insbesondere bei Hypoxie induzierter Ischämie der Ki67-Färbung überlegen ist, da Ki67 in apoptotischen Neuronen vermehrt exprimiert wird ohne, dass es zu einer vermehrten Zellteilung kommt (Kuan et al. 2004; von Bohlen und Halbach 2011). *Kuan et al.* beschreiben 2004 hierbei ebenfalls, dass eine mittels MCAO induzierte Ischämie zu keiner vermehrten pH3 Expression führt (Kuan et al. 2004). Somit ist die pH3-Färbung für diesen Versuchsaufbau gegenüber Ki67 die bessere Wahl.

Doublecortin Färbung

Die DCX Färbung ist hochspezifisch für sich differenzierende Neurone (von Bohlen und Halbach 2007, 2011).

Die gemessenen Zahlen sind generell höher, da es sich um einen kumulativen Effekt handelt, der durch die lange Ausreifungszeit der DCX-positiven Zellen bedingt ist. Die Zellen benötigen im Schnitt 14 bis 21 Tage zur vollständigen Differenzierung und Integration (Brown et al. 2003; Kempermann et al. 2004; von Bohlen und Halbach 2007). Währenddessen exprimieren sie durchweg DCX, mit einem Maximum um Tag sieben bzw. 14 (Brown et al. 2003; Kempermann et al. 2004; Parent et al. 2002). Entsprechend könnten die deutlich höheren Zellzahlen, im Vergleich mit denen der Momentaufnahme-Färbungen

pH3 oder Caspase 3, erklärt werden. Innerhalb einer Färbung dürfte sich dieser Effekt eliminieren, da sowohl behandelte Gruppen, wie auch Kontrollgruppen dieser Kumulation unterliegen. Ein Vergleich der absoluten gemessenen Zahlen zwischen den verschiedenen Färbungen ist somit nur bedingt möglich.

Caspase 3 Färbung

Ähnlich wie bei der pH3-Färbung besteht auch hier das Problem, dass die gemessene Zellzahl nicht repräsentativ für die eigentliche Substanzwirkung hinsichtlich des ischämischen Geschehens und der direkten Wirkung der Ang-(1-7) Derivate ist.

Erwähnenswert ist zudem, dass sich die Färbung unter dem Mikroskop sehr schwach darstellte. Es ist also nicht ausgeschlossen, dass die Rate an falsch-positiven und/oder falsch-negativen Zellen bei der Auswertung deutlich höher liegt wie bei den anderen Färbungen. Zumal die Zellen keine typische Morphologie aufwiesen anhand derer man eine eindeutige Zuordnung bei fraglicher Signalintensität vornehmen hätte können. Da sich der Zellkern in Auflösung befand, war auch der Wechsel zum DAPI Filter nicht immer eine zuverlässige Kontrollmöglichkeit.

Die Färbung der aktivierten Caspase 3 ist allerdings sehr spezifisch für sich in der Apoptose befindliche Zellen, da Caspase 3 in der Kaskade am Ende als Effektorenzym steht (Benchoua et al. 2001; Onténiente et al. 2003). Das heißt der Prozess ist unumkehrbar geworden und ein Abbau der Zellorganellen ist eingeleitet worden. Caspase 3 wird sowohl bei transienter als auch bei permanenter Ischämie rekrutiert (Onténiente et al. 2003). Die Aktivierung hält nicht besonders lange vor und anschließend wird die Zelle recht schnell durch immunkompetente Zellen phagozytiert (Amantea et al. 2015; deCathelineau et Henson 2003; Hu X et al. 2012). Der Zeitraum in dem exprimierende Zellen erfasst werden können ist insgesamt von kurzer Dauer (Chen et al. 1998).

Das Färbeprotokoll ist gut etabliert und in mehreren Arbeiten der Arbeitsgruppe bereits zur Anwendung gekommen (Dokter et al. 2015; Freund et al. 2013; Poser et al. 2015).

Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül 1 Färbung

IBA 1 wird von Zellen des MPS, im Gehirn von Zellen der Mikroglia Spezies exprimiert. Anhand der Morphologie lassen sich diese dann in aktiviert oder dormant einteilen (Taylor et

Sansing 2013). Mit dieser Information ergibt sich eine spezifische Färbung für aktivierte Mikroglia bzw. Zellen des MPS. Die dormanten Zellen zeigen sich mit rundem Soma und verästelten Ausläufern in regelmäßigen Abständen. Im aktivierten Zustand verschwinden die Fortsätze und die Zellen wandern zum Zielgebiet (Taylor et Sansing 2013). Da eine ischämische Läsion sehr viele dieser Zellen aktiviert und durch Zytokine anlockt (Hu et al. 2012; Szalay et al. 2016), ist die Ermittlung einzelner Zellen durch Zählung im Ischämiegebiet nicht realistisch. Um eine vermehrte Aktivität gegenüber dem Hintergrund zu bestimmen, wurde die gesunde Seite als Grundaktivität festgelegt. Dies kann dazu führen, dass etwaige Effekte die ebenfalls auf der gesunden Seite zu beobachten wären, dadurch nicht erfasst wurden. Da aber der Schwellenwert (*threshold*) auf die nicht-ischämische Hemisphäre der Kontrollgruppe bezogen wurde, könnte eine mögliche Veränderung der Aktivität in den behandelten Tieren ebenfalls miterfasst worden sein.

Außerdem wandern nach ischämischer Schädigung auch weitere Zellen des MPS ein (Szalay et al. 2016; Taylor et Sansing 2013). Entsprechend lässt sich nicht sicher rückschließen ob es sich bei den gefärbten Zellen ausschließlich um Mikroglia oder auch um Monozyten/Makrophagen handelt. Allerdings scheinen auch Makrophagen in der Lage zu sein neurotrophe und antiinflammatorische Faktoren zu sezernieren und damit eine schützende und regenerative Umgebung zu schaffen (Amantea et al. 2015; Janardhan et Qureshi 2004; Taylor et Sansing 2013).

Die gemessenen Zahlen der IBA 1 Färbung entstammen aufgrund der limitierten Probenzahl einem kleinen Stichprobenumfang, der einer breiten Streuung unterliegt (siehe Diagramm 6). Trotzdem ist ein möglicher Trend auszumachen und die oben gemachten Überlegungen, insbesondere hinsichtlich einer Antiinflammation und Regeneration müssen bei der Bewertung der Wirkung von Ang-(1-7) mit in Betracht gezogen werden.

Stärken und Schwächen des Vorversuches mit Auswirkungen auf die Arbeit

1. Zeitlicher Ablauf

Ein für die Auswertung sehr entscheidendes Problem ist der zeitliche Versatz der letztmaligen Substanzapplikation und der Euthanasie der Tiere.

Wäre bereits nach der Ischämie, also zu Beginn der Substanzapplikation und nach deren Ende, ebenfalls eine volumetrische Messung erfolgt, wäre ein Verlauf der Volumen Zu- oder Abnahme möglich gewesen. So ist letztlich nicht beurteilbar ob die Substanzapplikation Einfluss auf das Volumen hatte.

Sicherlich kann angenommen werden, dass die ischämisch geschädigte Hemisphäre ursprünglich ebenso groß wie die gesunde war. Aber ob der Schaden nach Beenden der Substanzapplikation größer oder kleiner wurde, vielleicht sogar konstant geblieben ist, bleibt unklar. Außerdem wäre es durch Messungen im Verlauf möglich gewesen, Kontrollen der Intervention durch MCAO hinsichtlich Zielgebiet, Effektivität und Konstanz zu erbringen. Bei mindestens einer gemessenen Proben schien dies nicht der Fall gewesen zu sein. Dadurch hätte man eventuell eine Egalisierung des Schadens in allen behandelten Tieren gewährleisten können.

Weiterhin sind die pH3-, Caspase 3- und die IBA 1-Färbungen in ihrer Aktivität sehr stark von denen zum Messzeitpunkt gegebenen Umgebungsfaktoren abhängig. Da allerdings in den 20 Tagen vor dem Messzeitpunkt keine Substanzapplikation erfolgte, ist eine eindeutige Beurteilung der Auswirkung der Substanz nicht möglich. Beurteilen lassen sich der kumulative Effekt sowie mögliche Kompensationsreaktionen, wobei eine Unterscheidung zwischen diesen nicht möglich ist. Demgegenüber steht, dass die gemessenen Zellzahlen in beiden Hemisphären der behandelten Gruppen im Mittel höher als die der Kontrollgruppe waren. Somit kann die erhöhte Aktivität als basale Normalfunktion ausgeschlossen werden und ist vielmehr als Reaktion bzw. Substanzeinfluss zu verstehen, da die Kontrollgruppe über den gesamten Zeitraum nur mit PBS behandelt wurde. Die gemessene Veränderung ihrer Zellzahlen spricht für eine erhöhte adulte Neurogenese gegenüber einem basalen Level und ist nicht (im Falle der Kontrollgruppe) als Suppression unter dieses basale Level zu verstehen, da der initiale Entzündungsreiz zum Messzeitpunkt bereits überwunden wurde (Fumagalli et al. 2015; Hu et al. 2012). In beiden behandelten Gruppen waren die gemessenen Zahlen der gesunden Hemisphäre aber höher als in der Kontrollgruppe. Die Differenzierung von der Progenitorzelle bis zum reifen Neuron dauert aber fast 30 Tage (Kempermann et al. 2004; von Bohlen und Halbach 2007). Somit kann es sich nur um entweder eine Kompensation nach zum Beispiel Suppression durch die Substanz oder aber um die Substanzwirkung selbst handeln.

Außerdem haben auch andere Studien vier bis fünf Wochen nach einem ischämischen Ereignis noch erhöhte Doublecortin Werte gemessen (Christie et Turnley 2012; Parent et al. 2002). Auch Mikroglia sind noch vier Wochen nach einem Ereignis aktiv (Gong et al. 2000; Jenkins et al. 1989; Regenhardt et al. 2014a). Sodass, auch wenn keine direkte Korrelation der

erhobenen Werte mit einem möglichen Effekt der Ang-(1-7) Derivate gegeben ist, eine stattgehabt Wirkung auch zum Messzeitpunkt beobachtet werden kann.

2. Verwendung von Angiotensin-(1-7)-Derivaten

Ang-(1-7) entfaltet eine anti-proliferative Wirkung an glatten Muskelzellen (Iusuf et al. 2008; Jiang et al. 2013), aber es scheint auch Einfluss auf die adulte Neurogenese zu haben (Freund et al. 2013). Da die applizierten Substanzen Derivate und nicht das native Ang-(1-7) sind, zumal sich die Substanzen untereinander unterscheiden, lassen sich möglicherweise Effekte, die normalerweise unter Ang-(1-7) Applikation zu beobachten wären, möglicherweise nicht oder verstärkt beobachten.

- Die Tatsache, dass der Hippocampus in dem die erhöhte DCX positive Zellzahl gemessen wurde, nicht direkt an der motorischen Regulation beteiligt ist, deren Verbesserung aber mit den neurologischen Punktwerten (engl. *Neuroscore*) gemessen wurde, wirft die Frage auf, ob die gemessenen Zellzahlen überhaupt in den Bezug zu den neurologischen Punktwerten gesetzt werden dürfen. Das Training der Fähigkeiten über den Zeitraum hinweg im Sinne von Lernen und episodischem Gedächtnis ist jedoch durchaus Hippocampus bezogen und würde für weiter routinierte Bewegungsabläufe im Cerebellum stattfinden (de Zeeuw et Brinke 2015; Doyon et al. 1997; Lee et al. 2018; von Bohlen und Halbach 2007; Winstein et al. 1999).
- Denkbar wäre auch eine mögliche (kompensatorische) Hyperproliferation nach Wegfall des Einflusses von Ang-(1-7). Entsprechend könnten die hohen DCX Zellzahlen in den behandelten Gruppen aufgrund des späten Messzeitpunktes durchaus durch eine kompensatorische Reaktion erklärt werden.

Dabei sollte allerdings in Betracht gezogen werden, dass *Freund et al.* in MAS-Knockout Mäusen 2013 eine erhöhte Dichte an Doublecortin exprimierenden Neuronen beschrieben haben (Freund et al. 2013). MAS als Rezeptor von Ang-(1-7) scheint einen Einfluss auf die adulte Neurogenese zu besitzen (Freund et al. 2013). Zwar weisen die Ratten der Gruppen TXA301 und TXA302 keinen MAS Defekt auf, aber die Applikation von Ang-(1-7)-Derivaten könnte, ähnlich anderer Rezeptorreaktionen in einem Organismus, zu einer Herabregulation des Rezeptors, ähnlich eines MAS-Knockout geführt haben. Berücksichtigt man diesen Gesichtspunkt, scheint eine Hyperproliferation wiederum nicht mehr wahrscheinlich, sodass durchaus

davon ausgegangen werden kann, dass die gemessenen Zahlen Folge der Substanzwirkung waren.

3. Diskussion des Tiermodells der Ratte

Die Übertragbarkeit von Tierversuchen auf Menschen ist insbesondere bei der Erforschung des ischämischen Schlaganfalls nicht sicher gewährleistet (Bracken 2009; Jickling 2015; Sommer 2017). Die Gründe hierfür sind sehr vielfältig, im Folgenden werden exemplarisch drei vorgestellt:

- Die Methode des tMCAO führt zu einer unnatürlichen Pathophysiologie, da der Abbruch der Durchblutung und das sofortige vollständige Wiedereinsetzen derselbigen nach dem Entfernen des Filaments im Gegensatz zum natürlichen Verlauf stehen (Jickling et Sharp 2015; Sommer 2017). Hier setzt die Perfusion allmählich wieder ein (Hossmann 2008). Außerdem beeinflusst laut *Hossmann* gerade die Phase der Reperfusion maßgeblich das neurologische Outcome (Hossmann 2008). Leider fügt *Hossmann* keine weiteren Belege hierfür an. *Sommer* führt 2017 jedoch zu Recht als Vorteil des Modells an, dass die sofortige Reperfusion den Vorgang einer mechanischen Thrombektomie, wie sie auch im klinischen Alltag stattfindet, nachahmt (Sommer 2017).
- Das Ausmaß der Schädigung ist im Verhältnis gesehen beim Menschen meist kleiner, wohingegen bei der Ratte ein Verschluss der A. cerebri media teilweise 2/3 bis die gesamte Hemisphäre umfasst. Häufig ist auch der Hippocampus betroffen (Hossmann 2008). Beim Menschen ist Letzterer beim Verschluss der A. cerebri media nicht involviert (Sommer 2017). Insofern erscheinen die Infarktgrößen relativ zu groß, da beim Menschen häufiger eine fokale Ischämie auftritt (Sommer 2017).
- Das Versetzen der Tiere in eine Narkose vor Setzen der Läsion ist fern der klinischen Realität und hat eventuell Einfluss auf die Stoffwechselfvorgänge (Sommer 2017).

Dennoch war die Methode der tMCAO sinnvoll gewählt, da der Pathomechanismus der Entzündungsreaktion identisch ist (Sommer 2017). Bei alternativen Modellen, wie zum Beispiel beim chirurgischen Verschluss eines Gefäßes während einer Kraniotomie, verändern sich Hirndruck und Temperatur oder es erfolgte eine zusätzliche Ödembildung im Falle der Photothrombose (Sommer 2017). Sicherlich wäre ein spontanes Schlaganfallszenario am realistischsten, allerdings ist dies aktuell nicht sinnvoll umsetzbar, da der Ereigniseintritt nicht immer klar auszumachen ist.

Weiterhin zeigt sich die Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke als realitätsnah, ein Faktor der insbesondere hinsichtlich der Verfügbarkeit der applizierten Angiotensin-Derivate sehr wichtig ist (Sommer 2017). Nur so kann eine Substanzwirkung sinnvoll untersucht werden.

Zu beachten ist weiterhin, dass im Menschen deutlich längere Halbwertszeiten des Ang-(1-7) nachgewiesen wurden (Iusuf et al. 2008; Kono et al. 1986; Ma et al. 2018), was sich wiederum positiv auf die Wirkung auswirken könnte.

Ein Beüben der Fähigkeiten, im Sinne einer Rehabilitationsbehandlung, durch das regelmäßige Durchführen der Tests im Vorversuch ist denkbar und könnte einen stimulierenden Faktor bei der Neuverknüpfung darstellen (Luo et al. 2014). Ob dieses Üben einen Einfluss auf die gemessene Verbesserung hatte, lässt sich nicht eindeutig beweisen, da alle drei Gruppen über den gesamten Zeitraum gleichmäßig beübt bzw. untersucht worden sind. Die Konstanz der Ergebnisse des neurologischen Punktwertes (engl. *neuroscore*) der Kontrollgruppe zeigt, dass dieser Effekt zwar marginal erscheint aber durchaus vorhanden war.

Der Versuchsaufbau durch Pharmaseed Ltd. war insofern sehr gut, dass das Studienprotokoll einer möglichen klinischen Situation nachempfunden wurde. Insbesondere hinsichtlich des Applikationsweges (subkutan) und des Applikationszeitpunktes (24 Stunden nach Ereignis). Viele Arbeiten wählen eine intrazerebroventrikuläre Applikationsform oder einen Applikationszeitpunkt der entweder während des ischämischen Ereignisses liegt oder sogar noch davor (Regenhardt et al. 2013, 2014a, 2014b). Entsprechend sind die möglichen Auswirkungen solcher Arbeiten nur bedingt in den klinischen Alltag übertragbar. Dies liegt mitunter an der kurzen Halbwertszeit von endogenem Ang-(1-7) die bei 22 Sekunden bis ca. zweieinhalb Minuten in der Ratte liegt (Iusuf et al. 2008; Ma et al. 2018). Insofern ist dies ein erster und sehr wichtiger Schritt hin zu einer zukünftigen klinischen Etablierung der Substanz(en).

Abschließende Bewertung der Stärken und Schwächen

Sicherlich hat diese Arbeit den Nachteil eines geringen Stichprobenumfangs. Allerdings ist das Ziel des Tierversuchs gewesen, einen möglichen neuen Therapieansatz zu prüfen und dies ist mit den vorliegenden Daten und Zusammenhängen gut möglich, wie im Abschnitt

Diskussion des Tiermodells dargelegt. Die Probenqualität war nicht perfekt und es gab nur einen histologischen Beobachtungszeitpunkt am Ende der Studie, was bei der Interpretation der Daten durchaus beachtet werden muss. Allerdings hat Ang-(1-7), wenn man der obigen Argumentation folgt und wie auch schon *Freund et al.* 2013 zeigen konnten, Einfluss auf die adulte Neurogenese (*Freund et al.* 2013). Dies zeigt sich in der vermehrten DCX Expression. Eine direkte Vergleichbarkeit mit anderen Studien ist aufgrund der Verschiedenheiten von Substanzen und Applikationswegen nur bedingt gegeben. Anderen Studien wählten meist eine intrazerebroventrikuläre Substanzapplikation, aber auch in diesen zeigte bereits ein Einfluss auf die adulte Neurogenese (*Regenhardt et al.* 2013, 2014a, 2014b). Diese Studie wählte erstmalig eine subkutane Applikation, die auch im klinischen Alltag gängige Praxis ist. Außerdem wurde ein realistisches Zeitfenster zwischen Applikation und Ereignis gewählt und die Tiere lange nachbeobachtet. Diese Bedingungen sind klare Stärken des Vorversuches im Bezug auf eine mögliche Übertragbarkeit. Die Substanz TXA302 hat eine deutliche Auswirkung auf die Zahl der DCX positiven Zellen und damit auch auf die adulte Neurogenese. Entsprechend lässt sich die Hauptfragestellung beantworten: Ang-(1-7) Derivate haben Einfluss auf die adulte Neurogenese im Rattenhippocampus (*Bennion et al.* 2015a; *Freund et al.* 2013).

Ausblick

Für einen zukünftigen Versuchsaufbau ließe sich diskutieren ob nicht direkt nach der Intervention mittels tMCAO und/oder am Ende der Substanzapplikation Messzeitpunkte angesetzt werden sollten, um eine Beurteilung im Verlauf und eine direkte Beobachtung der Effekte gewährleisten zu können. Überlegenswert wäre auch eine weitere Kontrollgruppe mit nativem Ang-(1-7) um den Effekt der Derivate abgrenzen zu können. Außerdem könnte eine größere Stichprobe gewählt werden. Weiterhin erstrebenswert wäre ein Versuchsaufbau mit spontanem Schlaganfall-Modell um eine realitätsnähere Reperfusion zu erreichen. Sollten sich in diesen Versuchen die Ergebnisse bestätigen wäre eine Diskussion einer möglichen Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus indiziert.

5.4 Schlussfolgerung

Neurogenese im Allgemeinen und die adulte Neurogenese im Speziellen, ist ein sehr vielfältig reguliertes System, das sowohl durch intrinsische als auch durch extrinsische Faktoren beeinflusst werden kann (Kempermann 2011). Ang-(1-7) kann einer dieser Faktoren sein:

Per se können Angiotensine die Blut-Hirn-Schranke nicht ohne Weiteres passieren, so auch Ang-(1-7) nicht (Harding et al. 1988; Schelling et al. 1976; van Houten et al. 1983; Wright et Harding 2011). Dieses wird aber nativ im Gehirn exprimiert (Bennion et al. 2015a; Freund et al. 2013; Jiang et al. 2013; von Bohlen und Halbach et Albrecht 2006; Wright et Harding 1994). Aber es gibt Hinweise, dass im Falle einer ischämischen Schädigung die Blut-Hirn-Schranke permeabler ist (Allen et Bayraktutan 2009; Regenhardt et al. 2014a).

2003 wird der MAS Rezeptor als Rezeptor für Ang-(1-7) identifiziert (Santos et al. 2003). *Freund et al.* beschreiben 2012 das Vorkommen des Rezeptors im Gehirn (Freund et al. 2012). 2013 können sie dann zeigen, dass ein Knockout des MAS Rezeptors und damit die Verfügbarkeit von Ang-(1-7), zu einer Veränderung der DCX Expression führt und dadurch Einfluss auf die adulte Neurogenese hat (Freund et al. 2013). Diese Veränderung wirft die Frage auf, wie sich die Gabe von Ang-(1-7) Derivaten unter unterschiedlichen Bedingungen auf die adulte Neurogenese auswirkt (Jiang et al. 2013, 2014; Regenhardt et al. 2014a, 2014b).

Ein neuroprotektiver Effekt durch Ang-(1-7) konnte bereits mehrfach, durch zum Beispiel *Bennion et al.*, nachgewiesen werden (Bennion et al. 2015a; Mecca et al. 2011; Regenhardt et al. 2014a).

Eine pharmakologische Modifikation von Ang-(1-7) könnte die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke verbessern bzw. überhaupt erst ermöglichen und somit eine therapeutische Wirkung entfalten, die die zu Grunde liegenden Pathomechanismen beeinflussen könnte. *Wright und Harding* beschreiben dieses Problem bereits 1994: Damals wurde ein Tripeptid synthetisiert, das ähnliche bzw. dieselben Ergebnisse hervorbrachte wie das Ursprungspeptid (Wright et Harding 1994). Unter anderem *Regenhardt et al.* machen 2014 darauf aufmerksam, dass eine intrazerebroventrikuläre Applikation so nicht alltagstauglich ist (Regenhardt et al. 2014a). *Iusuf et al.* weisen 2008 auf eine kurze Halbwertszeit in Ratten hin und sprechen mögliche strukturelle Modifikationen wie zum Beispiel eine Zyklisierung an (Iusuf et al. 2008).

Dass trotzdem das Gehirn nicht unbeeinflusst durch die peripheren Konzentrationsspiegel von Renin und Angiotensinen bleibt, haben *Wright et al.* festgestellt: gerade an den zirkumventrikulären Organen kommt es durchaus zu Interaktionen (Wright et Harding 1994, 2011).

Unklar bleibt aber, ob die durch Ang-(1-7) gedämpfte Immunreaktion die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke wieder herabsetzt, da die zugrundeliegende Entzündung nicht im selben Maße stattfindet wie ohne Therapie (Allen et Bayraktutan 2009; Jiang et al. 2012; Regenhardt et al. 2014a). Allerdings beschreiben Szalay *et al.*, 2016, dass die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke nur unwesentlich durch Mikroglia, sprich Entzündungszellen, beeinflusst wird, die wiederum durch Ang-(1-7) beeinflusst werden können (Regenhardt et al. 2014b; Szalay et al. 2016).

Die Substanzen TXA301 und TXA302 weisen gegenüber Ang-(1-7) eine dem Autor unbekannt Veränderung auf. Denkbar wäre nun, dass diese Modifikation entweder die Diffusionsfähigkeit von TXA302 deutlich verbesserte und die von TXA301 nur leicht verändert wurde oder aber, dass die Diffusionsfähigkeit beider Stoffe zugenommen hat, aber TXA301 im Gegensatz zu TXA302 nun schlechter am Zielrezeptor bindet. Denn die mit TXA302 behandelten Tiere zeigten, verglichen mit der TXA301 behandelten Gruppe, zum Ende der Vorversuche einen niedrigeren neurologischen Punktwert (engl. *Neuroscore*) (Krakovsky 2014). Zudem könnte durch die Veränderung die Halbwertszeit modifiziert worden sein, um eine Verlängerung der Wirkdauer und damit einen größeren Effekt zu erreichen (Iusuf et al. 2008).

Beide Substanzen führten zu einer höheren adulten Neurogeneserate im Hippocampus (Tabelle 1). Da es sich um Angiotensin Derivate oder Analoga handelt, ist eine Stimulation der adulten Neurogenese durch Ang-(1-7) unter Verweis auf Freund *et al.* von 2013 denkbar (Freund et al. 2013). Wobei dabei unklar bleibt, ob eine Zunahme der Proliferation oder lediglich eine Veränderung der DCX Expression stattfand.

Zusammen mit den Ergebnissen der pH3 Untersuchungen lassen sich die möglichen Auswirkungen auf die adulte Neurogenese weiter interpretieren. Offensichtlich hatten beide Substanzen einen Effekt auf die Zellteilung. Da der letzte Stimulus aber bereits 21 Tage zurückliegt und die pH3 positiven Zellen eine Momentaufnahme darstellen, ist eine direkte Verknüpfung dieser Zahlen mit den DCX positiven Zellen nicht möglich.

Nimmt man nun noch die Ergebnisse der Caspase 3 Färbung mit hinzu, ergeben sich jedoch folgende Schlüsse:

Gruppe TXA301

Sofern die Kontrollgruppe als Norm gewertet wird, zeigt sich, dass die mit TXA301 behandelte Gruppe TXA301 50 Tage postischämisch nahezu keine neue Zellteilung aufweist, bei gleichzeitiger ähnlich hoher Differenzierung zu Neuronen wie die Kontrollgruppe, mit

sehr hohen Apoptoseraten. Letztere muss nicht alleinig auf Neurone bezogen sein, die räumliche Zuordnung spricht aber dafür. Im Verlauf der Neurogenese sterben physiologisch einige Neurone in der Phase der Differenzierung ab (von Bohlen und Halbach 2007), aber Caspase 3 ist nicht Neuronen spezifisch (von Bohlen und Halbach 2011). Das Gleichgewicht der Progenitorzellen ist also stärker zur Neurogenese hin verschoben als in der Kontrollgruppe, da sich zwar weniger Zellen teilen, diese sich aber wiederum anteilig vermehrt zu Neuronen differenzieren, erkennbar an den gemessenen ähnlich großen DCX positiven Zellzahlen bei geringerer pH3 positiven Zellzahl (Diagramm 3 und Diagramm 4). Wobei dieses Argument insofern kritisch betrachtet werden muss, dass die aktuelle pH3 Zahl nicht direkt mit den jetzt DCX positiven Zellen korreliert.

Gleichzeitig scheinen in dieser Gruppe vermehrt Zellen zu sterben, ausgedrückt durch mehr Caspase 3 positive Zellen (Diagramm 5). Ob dies die sich zu Neuronen aus-differenzierenden Zellen oder andere Zellen sind, lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht beurteilen.

In vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe konnten bisher ähnliche Ergebnisse beobachtet werden, wenn es zu einer Veränderung am Renin – Angiotensin – System des Gehirns kam (Freund et al. 2013). Entsprechend lassen sich auch die jetzigen Ergebnisse deuten. Im Unterschied zu *Freund et al.* 2013 konnte jetzt keine erhöhte pH3 Aktivität gemessen werden. Da DCX positive Zellen weit über 21 Tage alt sind und pH3 ein Marker der aktuellen Zellteilungsrate ist, kann diese Diskrepanz hingenommen werden.

Unter der Annahme, dass das Gleichgewicht der Progenitorzellen zur Neurogenese verschoben ist, würde dies den Schluss zulassen, dass die neu gebildeten Neuronen absterben weil sie unter Umständen defekt sind, keinen Anschluss finden oder das entsprechende permissive Milieu fehlt. Ein weiterer möglicher Grund könnte der nun, durch Beenden der Substanzapplikation, ausbleibende Wachstumsreiz sein. Hierbei ist aber noch in Betracht zu ziehen, dass die niedrige pH3 Zellzahl dem aktuellen Messzeitpunkt entspricht. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die aktuelle Zahl der pH3 positiven Zellen nur dann mit den DCX positiven Zellen in Zusammenhang gebracht werden darf, wenn man annimmt, dass die Zellteilungsrate im Zeitraum nach letztmaliger Substanzapplikation unverändert geblieben ist. Die Halbwertszeit von TXA301 und TXA302 liegen dem Autor nicht vor. Da sie allerdings beide Ang-(1-7) ähnlich sind, dessen Halbwertszeit in vivo wiederum sehr kurz ist (Jiang et al. 2013; Kono et al. 1986; Ma et al. 2018), ist anzunehmen, dass diese ebenfalls nicht den vollen Zeitraum der 21 Tage umfassen. Die Zahl der pH3 positiven Zellen wird sich also im Verlauf der 21 Tage nach letztmaliger Applikation substanzunabhängig entwickelt haben. Ob sie im gesamten Zeitraum konstant gewesen ist, lässt sich allerdings nicht

rückschließen. Die Zahl der pH3 positiven Zellen während der Behandlung wird aber, da die Substanzapplikation eingestellt wurde und da als Argumentationsgrundlage von einer Auswirkung von Ang-(1-7) auf die adulte Neurogenese und damit auch auf die Zellteilungsrate ausgegangen wird, von der jetzt gemessenen Zahl abweichen. Die Zahl der DCX positiven Zellen ist eine kumulative, da der Expressionszeitraum mit ca. sieben bis 21 Tagen relativ lange ist (Brown et al. 2003; Kempermann et al. 2004). Die zum Messzeitpunkt DCX positiven Zellen haben sich also im Verlauf der letzten sieben bis 21 Tage zu differenzieren begonnen.

Sofern man davon ausgeht, dass die sterbenden Zellen nicht neuronalen Ursprungs sind und damit die hohe Caspase 3 Zahl hauptsächlich zugrunde gehende nicht neuronale Zellen repräsentiert und, dass mehr DCX exprimierende Zellen überleben als ohne Substanzapplikation, dann kommt es also zur vermehrten Ausbildung von Neuronen (Diagramm 3-5).

Gruppe TXA302

Für die mit TXA302 behandelte Gruppe TXA302 sind, verglichen mit der Kontrollgruppe, ebenfalls ähnliche Schlüsse möglich. Die vermehrte Zellteilung würde auf eine allgemeine Steigerung der Proliferationsrate hindeuten (Diagramm 3), sofern die DCX Expression ähnlich derjenigen der Kontrollgruppe wäre. Diese ist jedoch in dieser Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht und mindestens doppelt so hoch (Diagramm 4). Gleichzeitig ist die Apoptoserate gegenüber dem Niveau der Kontrollgruppe ein wenig erniedrigt (Diagramm 5). Dies legt den Schluss nahe, dass die sich differenzierenden Neurone überleben. Das Gleichgewicht der Progenitorzellen ist also auch hier zur vermehrten Neurogenese hin verschoben. Im Unterschied zur Gruppe TXA301 scheinen zum Messzeitpunkt aber mehr Neurone zu überleben. Im Zusammenhang mit dem neuronalen Punktwert (engl. *neuroscore*) könnte der Grund eine bessere Integration in das bestehende neuronale Netzwerk sein.

Eine immunmodulatorische Wirkung von Ang-(1-7) ist aufgrund der MAS-Rezeptor Expression auf Mikrogliazellen (Mecca et al. 2011) und dem Trend (Diagramm 6) anzunehmen. Sodass diese entzündungshemmende Wirkung eine zusätzliche Erklärung der der größeren Neuronenzahl bietet.

6 Zusammenfassung

TXA301 und TXA302 und damit Ang-(1-7) haben einen Einfluss auf die adulte Neurogenese, was sich anhand der gegenüber der Kontrollgruppe erhöhten DCX Zahlen beweisen lässt. Diese Neurone scheinen im Fall von TXA301 weniger gut zu überleben wie solche, die mit TXA302 behandelt wurden. Ebenfalls besteht ein messbarer Einfluss auf die Zellteilungsrate 21 Tage nach Applikationsende, da mehr pH3 positive Zellen gemessen werden konnten. Die Mikroglia Aktivität wurde durch Ang-(1-7) ebenfalls beeinflusst, wie sich in der IBA 1 Färbung zeigen ließ. Somit ist die Beeinflussung der adulten Neurogenese nach einem ischämischen Schlaganfall durch die Ang-(1-7) Derivate anzunehmen und sollte in größeren Studien weiter untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis - zitierte Literatur

- Albers GW, Marks MP, Kemp S, Christensen S, Tsai JP, Ortega-Gutierrez S, McTaggart RA, Torbey MT, Kim-Tenser M, Leslie-Mazwi T, et al. 2018. Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging. *N Engl J Med.* 378(8):708–718. eng. doi:10.1056/NEJMoa1713973.
- Allen CL, Bayraktutan U. 2009. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke.* 4(6):461–470. eng. doi:10.1111/j.1747-4949.2009.00387.x.
- Alqahtani SA, Luby M, Nadareishvili Z, Benson RT, Hsia AW, Leigh R, Lynch JK. 2017. Perfusion Deficits and Association with Clinical Outcome in Patients with Anterior Choroidal Artery Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 26(8):1755–1759. eng. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.04.001.
- Amantea D, Micieli G, Tassorelli C, Cuartero MI, Ballesteros I, Certo M, Moro MA, Lizasoain I, Bagetta G. 2015. Rational modulation of the innate immune system for neuroprotection in ischemic stroke. *Front Neurosci.* 9:147. eng. doi:10.3389/fnins.2015.00147.
- Arroja MMC, Reid E, McCabe C. 2016. Therapeutic potential of the renin angiotensin system in ischaemic stroke. *Exp Transl Stroke Med.* 8:8. eng. doi:10.1186/s13231-016-0022-1.
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L. 1981. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke.* 12(6):723–725. eng. doi:10.1161/01.STR.12.6.723.
- Bansal S, Sangha KS, Khatri P. 2013. Drug treatment of acute ischemic stroke. *Am J Cardiovasc Drugs.* 13(1):57–69. eng. doi:10.1007/s40256-013-0007-6.
- Basso N, Terragno NA. 2001. History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension.* 38(6):1246–1249. eng. doi:10.1161/hy1201.101214.
- Baxter P, Chen Y, Xu Y, Swanson RA. 2014. Mitochondrial dysfunction induced by nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1: A treatable cause of cell death in stroke. *Transl Stroke Res.* 5(1):136–144. eng. doi:10.1007/s12975-013-0283-0.
- Becker H, Desch H, Hacker H, Pencz A. 1979. CT fogging effect with ischemic cerebral infarcts. *Neuroradiology.* 18(4):185–192. eng. doi:10.1007/BF00345723.
- Begni V, Riva MA, Cattaneo A. 2017. Cellular and molecular mechanisms of the brain-derived neurotrophic factor in physiological and pathological conditions. *Clin. Sci.* 131(2):123–138. eng. doi:10.1042/CS20160009.
- Bellenchi GC, Volpicelli F, Piscopo V, Perrone-Capano C, Di Porzio U. 2013. Adult neural stem cells: An endogenous tool to repair brain injury? *J Neurochem.* 124(2):159–167. eng. doi:10.1111/jnc.12084.
- Benchoua A, Guégan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onténiente B. 2001. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci.* 21(18):7127–7134. eng. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-18-07127.2001.
- Bennion DM, Haltigan E, Regenhardt RW, Steckelings UM, Sumners C. 2015a. Neuroprotective mechanisms of the ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in stroke. *Curr Hypertens Rep.* 17(2):3. eng. doi:10.1007/s11906-014-0512-2.

- Bennion DM, Haltigan EA, Irwin AJ, Donnangelo LL, Regenhardt RW, Pioquinto DJ, Purich DL, Sumners C. 2015b. Activation of the Neuroprotective Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Rat Ischemic Stroke. *Hypertension*. 66(1):141–148. eng. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05185.
- Bracken MB. 2009. Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. *J R Soc Med*. 102(3):120–122. eng. doi:10.1258/jrsm.2008.08k033.
- Broussalis E, Killer M, McCoy M, Harrer A, Trinkka E, Kraus J. 2012. Current therapies in ischemic stroke. Part A. Recent developments in acute stroke treatment and in stroke prevention. *Drug Discov Today*. 17(7-8):296–309. eng. doi:10.1016/j.drudis.2011.11.005.
- Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*. 467(1):1–10. eng. doi:10.1002/cne.10874.
- Bruno A, Shah N, Akinwuntan AE, Close B, Switzer JA. 2013. Stroke size correlates with functional outcome on the simplified modified Rankin Scale questionnaire. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 22(6):781–783. eng. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.03.011.
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. 2001. Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke*. 32(4):1005–1011. doi:10.1161/01.STR.32.4.1005.
- Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP. 1998. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci*. 18(13):4914–4928. eng.
- Christie KJ, Turnley AM. 2012. Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair-factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain. *Front Cell Neurosci*. 6:1–18. eng. doi:10.3389/fncel.2012.00070.
- deCathelineau AM, Henson PM. 2003. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays Biochem*. 39:105–117. eng. doi:10.1042/bse0390105.
- de Zeeuw CI, ten Brinke MM. 2015. Motor Learning and the Cerebellum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7(9):a021683. eng. doi:10.1101/cshperspect.a021683.
- Dokter M, Busch R, Poser R, Vogt MA, von Bohlen und Halbach V, Gass P, Unsicker K, von Bohlen und Halbach, O. 2015. Implications of p75NTR for dentate gyrus morphology and hippocampus-related behavior revisited. *Brain Struct Funct*. 220(3):1449–1462. eng. doi:10.1007/s00429-014-0737-5.
- Dokter M, von Bohlen und Halbach, O. 2012. Neurogenesis within the adult hippocampus under physiological conditions and in depression. *Neural Regen Res*. 7(7):552–559. eng. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2012.07.013.
- Douglass J, Wcislo W. 2010. An inexpensive and portable microvolumeter for rapid evaluation of biological samples. *Biotech*. 49(2):566–572. doi:10.2144/000113464.
- Doyon J, Gaudreau D, Jr. R, Castonguay M, Bédard PJ, Bédard F, Bouchard J-P. 1997. Role of the Striatum, Cerebellum, and Frontal Lobes in the Learning of a Visuomotor Sequence. *Brain and Cognition*. 34(2):218–245. doi:10.1006/brcg.1997.0899.
- Fernandez-Calle R, Vicente-Rodriguez M, Gramage E, Pita J, Perez-Garcia C, Ferrer-Alcon M, Uribarri M, Ramos MP, Herradon G. 2017. Pleiotrophin regulates microglia-

- mediated neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 14(1):46. eng. doi:10.1186/s12974-017-0823-8.
- Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. 1985. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem*. 33(8):845–853. eng. doi:10.1177/33.8.3894502.
- Freund M, Walther T, von Bohlen und Halbach, O. 2012. Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1–7) receptor Mas in the murine forebrain. *Cell Tissue Res*. 348(1):29–35. doi:10.1007/s00441-012-1354-3.
- Freund M, Walther T, von Bohlen und Halbach, O. 2013. Effects of the angiotensin-(1–7) receptor Mas on cell proliferation and on the population of doublecortin positive cells within the dentate gyrus and the piriform cortex. *European Neuropsychopharmacology*. doi:10.1016/j.euroneuro.2013.06.004.
- Fumagalli S, Perego C, Pischiutta F, Zanier ER, de Simoni M-G. 2015. The ischemic environment drives microglia and macrophage function. *Front Neurol*. 6:81. eng. doi:10.3389/fneur.2015.00081.
- Ganten D, Marquez-Julio A, Granger P, Hayduk K, Karsunky KP, Boucher R, Genest J. 1971. Renin in dog brain. *Am J Physiol*. 221(6):1733–1737. eng. doi:10.1152/ajplegacy.1971.221.6.1733.
- Ganten D, Speck G. 1978. The brain renin-angiotensin system: A model for the synthesis of peptides in the brain. *Biochem Pharmacol*. 27(20):2379–2389. eng. doi:10.1016/0006-2952(78)90348-9.
- Gariel F, Lapergue B, Bourcier R, Berge J, Barreau X, Mazighi M, Kyheng M, Labreuche J, Fahed R, Blanc R, et al. 2018. Mechanical Thrombectomy Outcomes With or Without Intravenous Thrombolysis. *Stroke*. 49(10):2383–2390. eng. doi:10.1161/STROKEAHA.118.021500.
- Germanò AF, Dixon CE, d'Avella D, Hayes RL, Tomasello F. 1994. Behavioral Deficits Following Experimental Subarachnoid Hemorrhage in the Rat. *Journal of Neurotrauma*. 11(3):345–353. doi:10.1089/neu.1994.11.345.
- Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. 1934. Studies on experimental hypertension: I. the Production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*. 59(3):347–379. eng. doi:10.1084/jem.59.3.347.
- Gong C, Hoff JT, Keep RF. 2000. Acute inflammatory reaction following experimental intracerebral hemorrhage in rat. *Brain Res*. 871(1):57–65. eng. doi:10.1016/s0006-8993(00)02427-6.
- Goyal MS, Hawrylycz M, Miller JA, Snyder AZ, Raichle ME. 2014. Aerobic glycolysis in the human brain is associated with development and neotenus gene expression. *Cell Metab*. 19(1):49–57. eng. doi:10.1016/j.cmet.2013.11.020.
- Goyal N, Tsivgoulis G, Frei D, Turk A, Baxter B, Froehler MT, Mocco J, Pandhi A, Zand R, Malhotra K, et al. 2018. Comparative safety and efficacy of combined IVT and MT with direct MT in large vessel occlusion. *Neurology*. 90(15):e1274-e1282. eng. doi:10.1212/WNL.0000000000005299.
- Hans F, Dimitrov S. 2001. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*. 20(24):3021–3027. eng. doi:10.1038/sj.onc.1204326.
- Harding JW, Sullivan MJ, Hanesworth JM, Cushing LL, Wright JW. 1988. Inability of [125 I]Sar 1, Ile 8 -Angiotensin II to Move Between the Blood and Cerebrospinal

- Fluid Compartments. *J Neurochem.* 50(2):554–557. doi:10.1111/j.1471-4159.1988.tb02946.x.
- Higaki A, Mogi M, Iwanami J, Min L-J, Bai H-Y, Shan B-S, Kukida M, Yamauchi T, Tsukuda K, Kan-No H, et al. 2018. Beneficial Effect of Mas Receptor Deficiency on Vascular Cognitive Impairment in the Presence of Angiotensin II Type 2 Receptor. *J Am Heart Assoc.* 7(3). eng. doi:10.1161/JAHA.117.008121.
- Hossmann K-A. 2008. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology.* 55(3):257–270. eng. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.12.004.
- Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J. 2012. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 43(11):3063–3070. eng. doi:10.1161/STROKEAHA.112.659656.
- Hu X, de Silva TM, Chen J, Faraci FM. 2017. Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke. *Circ Res.* 120(3):449–471. eng. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308427.
- Hyman BT, Yuan J. 2012. Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. *Nat Rev Neurosci.* 13(6):395–406. eng. doi:10.1038/nrn3228.
- Iusuf D, Henning RH, van Gilst WH, Roks AJM. 2008. Angiotensin-(1-7): Pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol.* 585(2-3):303–312. eng. doi:10.1016/j.ejphar.2008.02.090.
- Janardhan V, Qureshi AI. 2004. Mechanisms of ischemic brain injury. *Curr Cardiol Rep.* 6(2):117–123. doi:10.1007/s11886-004-0009-8.
- Jauch EC, Saver JL, Adams HP JR, Bruno A, Connors JJB, Demaerschalk BM, Khatri P, McMullan PW JR, Qureshi AI, Rosenfield K, et al. 2013. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 44(3):870–947. eng. doi:10.1161/STR.0b013e318284056a.
- Jenkins A, Maxwell WL, Graham DI. 1989. Experimental Intracerebral Haematoma in the Rat: Sequential Light Microscopical Changes. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 15(5):477–486. doi:10.1111/j.1365-2990.1989.tb01247.x.
- Jiang T, Gao L, Guo J, Lu J, Wang Y, Zhang Y. 2012. Suppressing inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol.* 167(7):1520–1532. eng. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02105.x.
- Jiang T, Gao L, Lu J, Zhang Y-D. 2013. ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke. *Curr Neuropharmacol.* 11(2):209–217. eng. doi:10.2174/1570159X11311020007.
- Jiang T, Yu J-T, Zhu X-C, Zhang Q-Q, Tan M-S, Cao L, Wang H-F, Lu J, Gao Q, Zhang Y-D, et al. 2014. Angiotensin-(1-7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway. *Br. J. Pharmacol.* 171(18):4222–4232. eng. doi:10.1111/bph.12770.
- Jickling GC, Sharp FR. 2015. Improving the translation of animal ischemic stroke studies to humans. *Metab Brain Dis.* 30(2):461–467. eng. doi:10.1007/s11011-014-9499-2.

- Jonas S, Tran AQ, Eisenberg E, Azam M, Viera D, Grumet S. 1997. Does effect of a neuroprotective agent on volume of experimental animal cerebral infarct predict effect of the agent on clinical outcome in human stroke? *Ann N Y Acad Sci.* 825:281–287. eng. doi:10.1111/j.1749-6632.1997.tb48439.x.
- Kempermann G. 2011. Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience.* 33(6):1018–1024. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07599.x.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27(8):447–452. eng. doi:10.1016/j.tins.2004.05.013.
- Kempermann G, Neumann H. 2003. Neuroscience. Microglia: the enemy within? *Science.* 302(5651):1689–1690. eng. doi:10.1126/science.1092864.
- Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD, Fang MC, Fisher M, Furie KL, Heck DV, et al. 2014. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 45(7):2160–2236. eng. doi:10.1161/STR.0000000000000024.
- Kim S-W, Roh J, Park C-S. 2016. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med.* 50(6):411–418. eng. doi:10.4132/jptm.2016.08.08.
- Klempin F, Kronenberg G, Cheung G, Kettenmann H, Kempermann G. 2011. Properties of doublecortin-(DCX)-expressing cells in the piriform cortex compared to the neurogenic dentate gyrus of adult mice. *PLoS ONE.* 6(10):e25760. eng. doi:10.1371/journal.pone.0025760.
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. 1986. Experimental studies of ischemic brain edema. *Jpn. J. Stroke.* 8(1):1–8. doi:10.3995/jstroke.8.1.
- Kokaia Z, Martino G, Schwartz M, Lindvall O. 2012. Cross-talk between neural stem cells and immune cells: The key to better brain repair? *Nat Neurosci.* 15(8):1078–1087. eng. doi:10.1038/nn.3163.
- Kolominsky-Rabas PL, Wiedmann S, Weingartner M, Liman TG, Endres M, Schwab S, Buchfelder M, Heuschmann PU. 2015. Time trends in incidence of pathological and etiological stroke subtypes during 16 years: The Erlangen Stroke Project. *Neuroepidemiology.* 44(1):24–29. eng. doi:10.1159/000371353.
- Kono T, Taniguchi A, Imura H, Oseko F, Khosla MC. 1986. Biological activities of angiotensin II-(1-6)-hexapeptide and angiotensin II-(1-7)-heptapeptide in man. *Life Sci.* 38(16):1515–1519. eng. doi:10.1016/0024-3205(86)90565-5.
- Krakovsky M. 2014. Angiogenesis efficacy of TXA301 and TXA302 compounds in the rat stroke model (transient middle cerebral artery occlusion): Draft Report: TRX-010-EF. 1st ed. Ness-Ziona, 74047 Israel: Pharmaseed.
- Kuan C-Y, Schloemer AJ, Lu A, Burns KA, Weng W-L, Williams MT, Strauss KI, Vorhees CV, Flavell RA, Davis RJ, et al. 2004. Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. *J Neurosci.* 24(47):10763–10772. eng. doi:10.1523/JNEUROSCI.3883-04.2004.
- Lapergue B, Blanc R, Gory B, Labreuche J, Duhamel A, Marnat G, Saleme S, Costalat V, Bracard S, Desal H, et al. 2017. Effect of Endovascular Contact Aspiration vs Stent Retriever on Revascularization in Patients With Acute Ischemic Stroke and Large

- Vessel Occlusion: The ASTER Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 318(5):443–452. eng. doi:10.1001/jama.2017.9644.
- Lee J, Duan W, Mattson MP. 2002. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem*. 82(6):1367–1375. eng. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01085.x.
- Lee M, Saver JL, Alger JR, Hao Q, Salamon N, Starkman S, Ali LK, Ovbiagele B, Kim D, Villablanca JP, et al. 2012. Association of laterality and size of perfusion lesions on neurological deficit in acute supratentorial stroke. *Int J Stroke*. 7(4):293–297. eng. doi:10.1111/j.1747-4949.2011.00726.x.
- Lee RHC, Lee MHH, Wu CYC, Couto e Silva A, Possoit HE, Hsieh T-H, Minagar A, Lin HW. 2018. Cerebral ischemia and neuroregeneration. *Neural Regen Res*. 13(3):373–385. eng. doi:10.4103/1673-5374.228711.
- Lowry OH, Passoneau JV, Hasselberger FX, Schulz DW. 1964. Effect of Ischemia on Known Substrates and Cofactors of the Glycolytic Pathway in Brain. *Journal of Biological Chemistry*. 239:18–30. eng.
- Luo J, Hu X, Zhang L, Li L, Zheng H, Li M, Zhang Q. 2014. Physical exercise regulates neural stem cells proliferation and migration via SDF-1alpha/CXCR4 pathway in rats after ischemic stroke. *Neurosci Lett*. 578:203–208. eng. doi:10.1016/j.neulet.2014.06.059.
- Ma Q, Chu C, Song H. 2015. Intravenous versus intra-arterial thrombolysis in ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 10(1):e0116120. eng. doi:10.1371/journal.pone.0116120.
- Ma X, Pang Z, Zhou J, He L, Hao Q, Li W et al. 2018. Acetylation and Amination Protect Angiotensin 1-7 from Physiological Hydrolyzation and Therefore Increases Its Antitumor Effects on Lung Cancer. *Mol Pharm*; 15(6):2338–47.
- Mecca AP, Regenhardt RW, O'Connor TE, Joseph JP, Raizada MK, Katovich MJ, Summers C. 2011. Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. *Exp. Physiol*. 96(10):1084–1096. eng. doi:10.1113/expphysiol.2011.058578.
- Mistry EA, Mistry AM, Nakawah MO, Chitale RV, James RF, Volpi JJ, Fusco MR. 2017. Mechanical Thrombectomy Outcomes With and Without Intravenous Thrombolysis in Stroke Patients: A Meta-Analysis. *Stroke*. 48(9):2450–2456. eng. doi:10.1161/STROKEAHA.117.017320.
- Nam J, Jing H, O'Reilly D. 2015. Intra-arterial thrombolysis vs. standard treatment or intravenous thrombolysis in adults with acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Int J Stroke*. 10(1):13–22. eng. doi:10.1111/j.1747-4949.2012.00914.x.
- Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E. 1998. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters*. 102-103:139–142. doi:10.1016/s0378-4274(98)00298-7.
- Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, Yavagal DR, Ribo M, Cognard C, Hanel RA, et al. 2018. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med*. 378(1):11–21. eng. doi:10.1056/NEJMoa1706442.
- Obrenovitch TP. 1995. The ischaemic penumbra: Twenty years on. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 7(4):297–323. eng.

- Onténiente B, Rasika S, Benchoua A, Guégan C. 2003. Molecular pathways in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol.* 27(1):33–72. eng. doi:10.1385/MN:27:1:33.
- Ovbiagele B, Nguyen-Huynh MN. 2011. Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy. *Neurotherapeutics.* 8(3):319–329. eng. doi:10.1007/s13311-011-0053-1.
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM. 2002. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol.* 52(6):802–813. eng. doi:10.1002/ana.10393.
- Peach MJ. 1977. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 57(2):313–370. eng. doi:10.1152/physrev.1977.57.2.313.
- Poser R, Dokter M, von Bohlen und Halbach, V, Berger SM, Busch R, Baldus M, Unsicker K, von Bohlen und Halbach, O. 2015. Impact of a deletion of the full-length and short isoform of p75NTR on cholinergic innervation and the population of postmitotic doublecortin positive cells in the dentate gyrus. *Front Neuroanat.* 9:63. eng. doi:10.3389/fnana.2015.00063.
- Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, Biller J, Brown M, Demaerschalk BM, Hoh B, et al. 2018. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 49(3):e46-e110. eng. doi:10.1161/STR.000000000000158.
- Regenhardt RW, Bennion DM, Sumners C. 2014a. Cerebroprotective action of angiotensin peptides in stroke. *Clin. Sci.* 126(3):195–205. eng. doi:10.1042/CS20130324.
- Regenhardt RW, Desland F, Mecca AP, Pioquinto DJ, Afzal A, Mocco J, Sumners C. 2013. Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in ischemic stroke. *Neuropharmacology.* 71:154–163. eng. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.025.
- Regenhardt RW, Mecca AP, Desland F, Ritucci-Chinni PF, Ludin JA, Greenstein D, Banuelos C, Bizon JL, Reinhard MK, Sumners C. 2014b. Centrally administered angiotensin-(1-7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Exp. Physiol.* 99(2):442–453. eng. doi:10.1113/expphysiol.2013.075242.
- Rossi SL, Mahairaki V, Zhou L, Song Y, Koliatsos VE. 2014. Remodeling of the piriform cortex after lesion in adult rodents. *Neuroreport.* 25(13):1006–1012. eng. doi:10.1097/WNR.000000000000203.
- Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castren M, Castren E. 2005. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci.* 25(5):1089–1094. eng. doi:10.1523/JNEUROSCI.3741-04.2005.
- Santos RAS, Ferreira AJ, Simoes e Silva AC. 2008. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp. Physiol.* 93(5):519–527. eng. doi:10.1113/expphysiol.2008.042002.
- Santos, RAS, Simoes e Silva, AC, Maric C, Silva, DMR, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro, SVB, Lopes MT, Bader M, et al. 2003. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(14):8258–8263. eng. doi:10.1073/pnas.1432869100.
- Schelling P, Hutchinson JS, Ganten U, Sponer G, Ganten D. 1976. Impermeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier for angiotensin II in rats. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 3:399s-402s. eng. doi:10.1042/cs051399s.

- Schwengel K, Namsolleck P, Lucht K, Clausen BH, Lambertsen KL, Valero-Esquitino V, Thone-Reineke C, Muller S, Widdop RE, Denton KM, et al. 2016. Angiotensin AT2-receptor stimulation improves survival and neurological outcome after experimental stroke in mice. *J Mol Med (Berl)*. 94(8):957–966. eng. doi:10.1007/s00109-016-1406-3.
- Sommer CJ. 2017. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 133(2):245–261. eng. doi:10.1007/s00401-017-1667-0.
- Statistisches Bundesamt. 2020a. Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 (Fälle/Sterbefälle, Fälle je 100000 Einwohner). Gliederungsmerkmale: Jahre, Wohnsitz, Alter, Geschlecht, Verweildauer, ICD-4-Steller, Art der Standardisierung. [zuletzt geprüft am 18.11.2020]. <http://www.gbe-bund.de/gbe10/i?i=703:39507640D>.
- Statistisches Bundesamt. 2020b. Sterbefälle, Sterbeziffern (je 100.000 Einwohner, altersstandardisiert) (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, Nationalität, ICD-10, Art der Standardisierung: Sortierung nach ICD 63. [zuletzt geprüft am 18.11.2020]. <http://www.gbe-bund.de/gbe10/i?i=6:39507695D>.
- Szalay G, Martinecz B, Lénárt N, Környei Z, Orsolits B, Judák L, Császár E, Fekete R, West BL, Katona G, et al. 2016. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat Commun*. 7:11499. eng. doi:10.1038/ncomms11499.
- Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. 2005. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 289(4):H1560-6. eng. doi:10.1152/ajpheart.00941.2004.
- Taylor RA, Sansing LH. 2013. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clin Dev Immunol*. 2013:746068. eng. doi:10.1155/2013/746068.
- Tigerstedt R, Bergman PQ. 1898. Niere und Kreislauf 1. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie*. 8(1):223–271. doi:10.1111/j.1748-1716.1898.tb00272.x.
- Tsai H-J, Liao M-H, Shih C-C, Ka S-M, Tsao C-M, Wu C-C. 2018. Angiotensin-(1-7) attenuates organ injury and mortality in rats with polymicrobial sepsis. *Crit Care*. 22(1):269. eng. doi:10.1186/s13054-018-2210-y.
- Tsivgoulis G, Katsanos AH, Mavridis D, Alexandrov AW, Magoufis G, Arthur A, Caso V, Schellinger PD, Alexandrov AV. 2017. Endovascular thrombectomy with or without systemic thrombolysis? *Ther Adv Neurol Disord*. 10(3):151–160. eng. doi:10.1177/1756285616680549.
- Turc G, Bhogal P, Fischer U, Khatri P, Lobotesis K, Mazighi M, Schellinger PD, Toni D, de Vries J, White P, et al. 2019. European Stroke Organisation (ESO) – European Society for Minimally Invasive Neurological Therapy (ESMINT) Guidelines on Mechanical Thrombectomy in Acute Ischaemic Stroke Endorsed by Stroke Alliance for Europe (SAFE). *European Stroke Journal*. 4(1):6–12. doi:10.1177/2396987319832140.
- van Houten M, Mangiapane ML, Reid IA, Ganong WF. 1983. [Sar,Ala]angiotensin II in cerebrospinal fluid blocks the binding of blood-borne [125I]angiotensin II to the circumventricular organs. *Neuroscience*. 10(4):1421–1426. eng. doi:10.1016/0306-4522(83)90123-9.
- von Bohlen und Halbach O. 2005. The Renin-Angiotensin System in the Mammalian Central Nervous System. *CPPS*. 6(4):355–371. doi:10.2174/1389203054546361.

- von Bohlen und Halbach, O., Albrecht D. 2006. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res.* 326(2):599–616. eng. doi:10.1007/s00441-006-0190-8.
- von Bohlen und Halbach, O. 2007. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 329(3):409–420. doi:10.1007/s00441-007-0432-4.
- von Bohlen und Halbach, O. 2011. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 345(1):1–19. doi:10.1007/s00441-011-1196-4.
- Wang X, Luo Y, Sun H, Feng J, Ma S, Liu J, Huang B. 2015. Dynamic expression changes of Bcl-2, Caspase-3 and Hsp70 in middle cerebral artery occlusion rats. *Brain Inj.* 29(1):93–97. eng. doi:10.3109/02699052.2014.945958.
- Wardlaw JM, Koumellis P, Liu M. 2013. Thrombolysis (different doses, routes of administration and agents) for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* (5):CD000514. eng. doi:10.1002/14651858.CD000514.pub3.
- Winstein CJ, Merians Alma S., Sullivan KJ. 1999. Motor learning after unilateral brain damage. *Neuropsychologia.* 37(8):975–987. doi:10.1016/S0028-3932(98)00145-6.
- Wright JW, Harding JW. 1994. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev.* 18(1):21–53. eng. doi:10.1016/0149-7634(94)90034-5.
- Wright JW, Harding JW. 2011. Brain renin-angiotensin—a new look at an old system. *Prog Neurobiol.* 95(1):49–67. eng. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.07.001.
- Zhang F, Hu Y, Xu Q, Ye S. 2010. Different effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *PLoS ONE.* 5(8):e12323. eng. doi:10.1371/journal.pone.0012323.

8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 – Aufbau der Volumenbestimmung: 1) Einstellung des Flüssigkeitsspiegels auf Höhe des Eichstriches, 2) Einbringen der Probe in das 10ml Gefäß, 3) erneutes Einstellen des Flüssigkeitsspiegels auf den Eichstrich und Ablesen des Volumens auf den Ausgleichsspritzen. (10ml Spritze: Becton Dickinson GmbH, DE; 1ml Spritze: B. Braun Melsungen AG, DE; Dreivegehaun: B. Braun Melsungen AG, DE; Bilderstellung: Microsoft Paint, USA)..... 21
- Abbildung 2 – Dargestellt ist ein Schnitt des Gyrus dentatus. Zu sehen sind Doublecortin positive Neurone (gelb) in unterschiedlichen Reifestadien. 2) zeigt eine Progenitorzelle im Stratum subgranulosum. 1) ein sich entwickelndes Neuron. 3) die Soma der hier Doublecortin positiven Dendriten befinden sich außerhalb der Schnittebenen. Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI-Kernfärbung). Die Aufnahmen erfolgten mit einem Olympus BX 63 Mikroskop (Objektiv 20x) mit der Software CellSens (Olympus, JPN) (Bildbearbeitung: Dekonvolutionsalgorithmus „nearest neighbour“, Zuschnitt und Markierung: Microsoft Paint, USA)..... 24
- Abbildung 3 - Dargestellt ist ein Schnitt des Gyrus dentatus. Zu sehen ist ein pH3 positiver Zellkern (gelb mit rotem Kreis), sonstige Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI-Kernfärbung). Die Aufnahmen erfolgten mit einem Olympus BX 63 Mikroskop (Objektiv 20x) mit der Software CellSens (Olympus, JPN) (Bildbearbeitung: Dekonvolutionsalgorithmus „nearest neighbour“, Zuschnitt und Markierung: Microsoft Paint, USA)..... 25
- Abbildung 4 - Dargestellt ist ein Schnitt des Gyrus dentatus. Zu sehen ist ein Caspase 3 positive Zelle (gelb mit rotem Kreis), sonstige Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI-Kernfärbung). Die Aufnahmen erfolgten mit einem Olympus BX 63 Mikroskop (Objektiv 20x) mit der Software CellSens (Olympus, JPN) (Bildbearbeitung: Dekonvolutionsalgorithmus „nearest neighbour“, Zuschnitt und Markierung: Microsoft Paint, USA)..... 26
- Abbildung 5 – Dargestellt ist ein Schnitt einer Hemisphäre an der Randzone zum ischämisch geschädigten Areal. Zu sehen sind IBA1 positive Mikroglia (gelb), sonstige Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI-Kernfärbung). 1) eine ruhende Mikrogliazelle mit weit verzweigten dendritischen Fortsätzen. 2) und 3) exemplarische aktivierte Mikrogliazellen ohne Zellfortsätze. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Olympus BX 63 Mikroskop (Objektiv 20x) mit der Software CellSens (Olympus, JPN) (Bildbearbeitung: Dekonvolutionsalgorithmus „nearest neighbour“, Zuschnitt und Markierung: Microsoft Paint, USA)..... 27

9 Diagrammverzeichnis

- Diagramm 1 - Hemisphärenvolumen; einseitiger ANOVA a posteriori Tukey's multiple comparison test, Mediane mit Quartilen, $p < 0,05$ wurde mit einem * dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Volumina der gesunden Seite gegenüber der ischämischen Seite innerhalb einer Gruppe. Die Streuung innerhalb der Hemisphären war gering. Die Mediane der korrelierenden Hemisphären der jeweiligen Gruppen lagen ebenfalls auf ähnlichem Niveau. 36
- Diagramm 2 - Hemisphärgewicht; einseitiger ANOVA a posteriori Tukey's multiple comparison test, Mediane mit Quartilen, $p < 0,05$ wurde mit einem * dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Gewichte der gesunden Seite gegenüber der ischämischen Seite innerhalb einer Gruppe. Die Streuung innerhalb der Hemisphären war gering. Die Mediane der korrelierenden Hemisphären der jeweiligen Gruppen lagen ebenfalls auf ähnlichem Niveau. 38
- Diagramm 3 - Zahl der pH3 positiven Zellen im Gyrus dentatus; einseitiger ANOVA a posteriori Tukey's multiple comparison test, Mediane mit Quartilen, $p < 0,05$ wurde mit einem * dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Zellzahlen der gesunden und ischämischen Seiten der Gruppen TXA301 und TXA 302. Die Streuung innerhalb der Kontrollgruppe und TXA301 war gering. Die Mediane der korrelierenden Hemisphären innerhalb einer Gruppe (Kontrollgruppe und TXA301) lagen auf ähnlichem Niveau. TXA302 wies eine größere Streuung und auch interhemisphärisch unterschiedliche Mediane auf. 40
- Diagramm 4 - Zahl der Doublecortin positiven Zellen im Gyrus dentatus; einseitiger ANOVA a posteriori Tukey's multiple comparison test, Mediane mit Quartilen, $p < 0,05$ wurde mit einem * dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der gesunden Hemisphäre der Kontrollgruppe und der von TXA302. Die Mediane von TXA302 waren auf ähnlichem Niveau. Die der anderen Gruppen divergierten stark. 42
- Diagramm 5 - Zahl der Caspase 3 positiven Zellen im Gyrus dentatus; einseitiger ANOVA a posteriori Tukey's multiple comparison test, Mediane mit Quartilen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Mediane der Kontrollgruppe und von TXA302 lagen auf ähnlichem Niveau. TXA301 wies eine größere Streuung auf. 44
- Diagramm 6 - Prozent der durch IBA 1 positiven Zellen bedeckten Fläche im Striatum; einseitiger ANOVA a posteriori Tukey's multiple comparison test, Mediane mit Quartilen. Die Auswertung erfolgte in cellSens Dimension (Olympus, JPN). Es wurde ein ROI mit der Funktion „Zählen und Messen“ ausgewählt und dann ein Schwellenwert im Histogramm zwischen 3500 und 17000 (dimensionslos) festgelegt. Weiterhin wurde definiert, dass nur Flächen größer als 25 Pixel zur Gesamtfläche hinzugezählt wurden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Mediane der gesunden Hemisphären lagen auf ähnlichem Niveau. 46

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Hemisphärevolumen in Milliliter, Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQA) sowie der Stichprobenumfang n.....	37
Tabelle 2 - Gewicht der Hemisphären in Gramm, Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQA) sowie der Stichprobenumfang n.....	39
Tabelle 3 - Zahl der pH3 positiven Zellen je Hemisphäre, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQA) sowie der Stichprobenumfang n.....	41
Tabelle 4 - Zahl der Doublecortin positiven Zellen je Hemisphäre, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQA) sowie der Stichprobenumfang n....	43
Tabelle 5 - Zahl der Caspase 3 positiven Zellen je Hemisphäre, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQA) sowie der Stichprobenumfang n....	45
Tabelle 6 – Mittelwerte aus den ausgewerteten Schnitten der mit IBA 1 positiven Zellen bedeckten Fläche, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQA), der Stichprobenumfang n sowie Differenzen der bedeckten Flächen der Hemisphären. Hierfür wurden die Mittelwerte der jeweils angegeben Hemisphären subtrahiert. Wobei im Falle „ischämisch-gesund“ die Subtraktion in derselben Gruppe stattfand, im Falle von „gesund-gesund“ und „ischämisch-ischämisch“ war die korrespondierende Hemisphäre der jeweils anderen Gruppe der Bezug. Es zeigte sich, dass der Unterschied innerhalb der Gruppe erheblich, aber ähnlich war. Im Vergleich mit der jeweils anderen Gruppenhemisphäre zeigte sich, dass das Ergebnis, im Falle der gesunden Hemisphären, nahezu identisch war.....	47

11 Anhänge

keine