

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Allgemeine Neurologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Heinz Wiendl -

**Der Einfluss des Peptidhormons Ghrelin
auf die funktionelle und strukturelle Erholung
im Schlaganfallmodell der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Eggert, Verena

aus Herford

2014

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Jens Minnerup

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Christian Ertmer

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Allgemeine Neurologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Heinz Wiendl -
Referent: PD Dr. med. Jens Minnerup
Koreferent: PD Dr. med. Christian Ertmer

ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluss des Peptidhormons Ghrelin für die funktionelle und strukturelle Erholung im Schlaganfallmodell der Ratte

Eggert, Verena

Ghrelin ist ein Peptidhormon, das im Magen gebildet wird. Physiologischer Weise steigert Ghrelin die Nahrungsaufnahme und ist somit an der Regulation des Körpergewichtes und des Glucosehaushalts beteiligt. Neben diesen, über die Hypophyse und den Hypothalamus vermittelten Effekten, moduliert Ghrelin auch kognitive Funktionen. Hierbei wirkt Ghrelin über eine Steigerung der Neurogenese, also der Neubildung von Neuronen. Neben der Bedeutung für die Gedächtnisbildung stellt die Neurogenese einen Regenerationsmechanismus nach Hirninfarkt dar. Ob Ghrelin die Regeneration nach fokaler Ischämie fördert, ist bislang jedoch unbekannt.

In dieser experimentellen Arbeit wurde untersucht ob Ghrelin die funktionelle Erholung nach einem ischämischen Hirninfarkt steigert und welcher Mechanismus dem zugrunde liegt. Hierfür wurden bei Ratten ischämische Schlaganfälle durch photothrombotische Läsionen erzeugt. Den Versuchstieren wurde Ghrelin bzw. Plazebo 24 Stunden postischämisch und für weitere sechs Tage verabreicht. Zur Erfassung der funktionellen Erholung wurden über einen Zeitraum von vier Wochen Verhaltenstests durchgeführt. Am Tag 28 wurden die Versuchstiere perfundiert. Nach Entnahme der Gehirne erfolgten histologische Untersuchungen zur Quantifizierung der Infarktolumina und der Neurogenese im Bereich der Hippocampusregion und der Subventrikulärzone.

In dieser Arbeit konnten erstmals neuroregenerative Effekte von Ghrelin nach Hirninfarkt nachgewiesen werden. Die über einen Zeitraum von 28 Tagen erhobenen Verhaltenstestdaten zeigten signifikante Verbesserungen sensomotorischer Funktionen in der Therapiegruppe. Als Mechanismus der verbesserten funktionellen Erholung durch die Ghrelinbehandlung wurde eine gesteigerte Neurogeneserate im Bereich von Hippocampus und Subventrikulärzone detektiert. Anhand der histologischen Verfahren konnte nach Behandlung mit Ghrelin 28 Tage nach Ischämie eine signifikant erhöhte Anzahl neuentstandener Zellen nachgewiesen werden, die zu höherem Anteil neuronaler Herkunft war. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Ghrelin nicht nur die Entstehung neuer Zellen und deren Differenzierung zu Neuronen fördert, sondern zusätzlich das langfristige Überleben dieser Zellen sichert.

Genehmigung des Tierversuches: 10.05.2010, Aktenzeichen 87-51.04.2010.A0
Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2014

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

**Der Einfluss des Peptidhormons Ghrelin auf die funktionelle
und strukturelle Erholung im Schlaganfallmodell der Ratte**

im Universitätsklinikum Münster,
in der Klinik für Allgemeine Neurologie,
unter Anleitung von PD Dr. med. Jens Minnerup

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Münster, den 12.12.2014

Unterschrift:

VERENA EGGERT

DANKSAGUNG

Ich möchte mich hiermit bei Herrn PD Dr. med. Jens Minnerup, dem Leiter der Arbeitsgemeinschaft für Experimentelle und Translationale Schlaganfallforschung, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Vielen Dank für die interessante Themastellung und die zuverlässige Betreuung während der gesamten Arbeit.

Dr. rer. nat. Kai Diederich danke ich besonders für die hervorragende Betreuung und Hilfestellung im Labor. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Bei meiner Familie möchte ich mich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	SEITE 01-14
1.1 Der Schlaganfall	Seite 01-10
1.1.1 Definition	
1.1.2 Ätiologische Einteilung	
1.1.3 Anatomische Einteilung	
1.1.4 Epidemiologie	
1.1.5 Klinik	
1.1.6 Pathophysiologie	
1.1.6.1 Zerebrale Perfusion	
1.1.6.2 Zerebrale Ischämie	
1.1.6.3 Zelltod	
1.1.6.4 Inflammation	
1.1.7 Neuroregeneration	
1.1.7.1 Neurogenese	
1.1.7.2 Neurogenese nach ischämischem Hirninfarkt	
1.1.8 Therapie	
1.1.8.1 Akuttherapie	
1.1.8.2 Sekundärprophylaxe	
1.1.8.3 Rehabilitation	
1.2 Schlaganfall im Tiermodell	Seite 10-12
1.2.1 Anforderungen an ein Schlaganfallmodell	
1.2.2 Fadenokklusionsmodell	
1.2.3 Photothrombose	
1.3 Ghrelin	Seite 12-14
1.3.1 Physiologische Funktionen von Ghrelin	
1.3.2 Pharmakologie von Ghrelin	
1.3.3 Neuroprotektion und Neuroregeneration durch Ghrelin	
1.4 Zielsetzung der Arbeit	Seite 14-14

2. MATERIALIEN UND METHODEN	SEITE 15-29
2.1 Versuchstiere	Seite 15-15
2.2 Experimentelles Design der Studie	Seite 15-16
2.3 Sensomotorische Verhaltenstests	Seite 16-19
2.3.1 Rota Rod Test	
2.3.2 Adhesive Tape Test	
2.3.3 Zylinder Test	
2.4 Ischämieinduktion	Seite 19-21
2.4.1 Narkose	
2.4.2 Intraoperative Lagerung	
2.4.3 Einsetzen eines Katheters in die Vena femoralis	
2.4.4 Induktion der photothrombotischen Läsion	
2.5 Therapie	Seite 21-21
2.6 BrdU-Markierung	Seite 21-22
2.7 Präparation der Gehirne	Seite 22-22
2.8 Gewinnung der Gewebeproben	Seite 22-22
2.9 Färbungen der Gewebeproben	Seite 23-24
2.9.1 Toluidinfärbung	
2.9.2 BrdU/NeuN Färbung	
2.9.3 DCX Färbung	
2.10 Auswertung	Seite 24-26
2.10.1 Auswertung der Verhaltensuntersuchungen	
2.10.2 Auswertung der Histologie	
2.11 Statistische Auswertung	Seite 26-26
2.12 Färbeprotokolle und Materialien	Seite 26-29
2.12.1 Toluidinfärbung	
2.12.2 BrdU/NeuN Färbung	
2.12.3 DCX Färbung	

3. ERGEBNISSE	SEITE 30-39
3.1 Verhaltensuntersuchungen	Seite 30-33
3.1.1 Gewichtsverlauf der Tiere	
3.1.2 Rota Rod Test	
3.1.3 Adhesive Tape Test	
3.1.4 Zylindertest	
3.2 Histologische Untersuchungen	Seite 33-39
3.2.1 Toluidinfärbung	
3.2.2 BrdU/ NeuN Färbung	
3.2.3 DCX Färbung	
4. DISKUSSION	SEITE 40-47
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	Seite 40-40
4.2 Interpretation der Ergebnisse	Seite 40-42
4.2.1 Verhaltensuntersuchungen und Gewichtsverlauf	
4.2.2 Histologische Untersuchungen	
4.3 Literaturkontext	Seite 42-44
4.4 Klinische Implikation	Seite 45-46
4.5 Stärken und Limitationen der Arbeit	Seite 46-47
4.6 Zusammenfassung und Ausblick	Seite 47-47
5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	SEITE 48-49
6. LITERATURVERZEICHNIS	SEITE 50-62

1. EINLEITUNG

1.1 Der Schlaganfall

1.1.1 Definition

Der Begriff Schlaganfall beschreibt einen klinischen Zustand, der durch ein akut einsetzendes fokal-neurologisches Defizit gekennzeichnet ist (Herold, 2010). Unter dem klinischen Syndrom des Schlaganfalles werden verschiedene Krankheitsbilder vaskulärer Genese zusammengefasst (Mumenthaler, 2008).

1.1.2 Ätiologische Einteilung

Ätiologisch können ischämische Hirninfarkte, die mit 80-85% am häufigsten auftreten, von hämorrhagischen Schlaganfällen abgegrenzt werden (Mumenthaler, 2008). Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschließlich mit ischämischen Hirninfarkten. Auf die nichttraumatischen intrakraniellen Blutungen, die ebenfalls unter den Begriff des Schlaganfalls fallen, wird nicht näher eingegangen.

Die TOAST Klassifikation, die nach der gleichnamigen Studie „Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment“ von 1993 benannt wurde, unterscheidet nach ätiologischen Kriterien fünf Untergruppen ischämischer Hirninfarkte: makroangiopathische, kardiogene und mikroangiopathische Hirninfarkte, Hirninfarkte anderer gesicherter Ursache sowie Hirninfarkte ungeklärter Ursache (Adam et al, 1993).

Bei makroangiopathischen Hirninfarkten kommt es, bedingt durch arteriosklerotische Plaques an großen hirnversorgenden Gefäßen, zur Bildung ortsständiger Thromben. Diese können durch kompletten Verschluss des Gefäßes oder bei Verschleppung von Thrombusbestandteilen durch Embolien zu ischämischen Infarkten führen (Adam et al, 1993).

Kardiogene Hirninfarkte werden durch einen Embolus kardiogenen Ursprungs verursacht, der zur Verlegung einer Hirnarterie führt (Berlit, 2013). Ursächliche Herzerkrankungen sind unter anderem Vorhofflimmern, insbesondere in

Kombination mit anderen kardiovaskulären Erkrankungen, ein persistierendes Foramen Ovale, mechanische Herzklappen, Kardiomyopathien und infektiöse Endokarditiden (Ferro, 2003).

Eine langjährige arterielle Hypertonie begünstigt insbesondere die Entstehung fibrinoider Nekrosen durch den Eintritt von Plasmaproteinen in die Gefäßwände kleiner Hirnarteriolen. Von dieser sogenannten Lipohyalinose sind besonders kleine Hirngefäße im Bereich von Stammganglien, Hirnstamm sowie weißer Substanz der Groß- und Kleinhirnhemisphären betroffen. Diese sogenannte Mikroangiopathie hat häufig kleine, diffuse Hirninfarkte zur Folge, die als lakunäre Infarkte bezeichnet werden (Adam et al, 1993).

1.1.3 Anatomische Einteilung

Anatomisch können Hirninfarkte nach der Größe des betroffenen Gefäßes in Territorialinfarkte, Grenzzoneninfarkte und Lakunäre Infarkte differenziert werden.

Bei Territorialinfarkten kommt es durch Thrombus oder Embolus zum Verschluss eines großen hirnzuführenden Gefäßes. Die resultierenden neurologischen Symptome lassen häufig auf das betroffene Gefäß schließen (Mumenthaler, 2008). Grenzzoneninfarkte sind ebenfalls Folge von Läsionen großer Gefäße. In der sogenannten Grenzzone zwischen zwei Versorgungsgebieten kommt es zur Minderperfusion durch reduzierten Perfusionsdruck in zuführenden Gefäßen (Berlit, 2013). Lakunäre Infarkte entstehen in Folge von Mikroangiopathien, die häufig arteriosklerotisch bedingt sind und subkortikal im Bereich von Capsula interna, Thalamus und Stammganglien lokalisiert sind (Fisher, 1982).

1.1.4 Epidemiologie

In der Todesursachenstatistik Deutschlands liegt der Schlaganfall auf Platz zwei der Häufigkeit (Heuschmann et al., 2010). Die Ein-Jahres-Mortalität beträgt 40% (Kolominsky-Rabas et al., 2006). Die Morbidität nach Schlaganfällen ist ebenfalls beträchtlich. Schlaganfälle sind die häufigste Ursache für Behinderungen im Erwachsenenalter (Johnston et al., 2009). Etwa 25% der

Patienten zeigen drei Monate nach erstmaligem Schlaganfallereignis noch schwere Einschränkungen in den Aktivitäten des täglichen Lebens (Barthel Index < 60) (Schneider et al., 2009). Dabei waren, laut der gleichen Studie, 28,3% der Schlaganfallpatienten dauerhaft durch Angehörige, ambulante Pflegedienste oder Pflegeheime auf Hilfe angewiesen.

Die direkten Kosten für die medizinische Versorgung von Schlaganfallpatienten sowie die indirekten Kosten durch frühzeitige Berufsunfähigkeit belasten die Gesundheitskassen zunehmend. Derzeit entfallen in Industrieländern 2-5% der Gesundheitskosten auf die Versorgung von Schlaganfallpatienten (Saka et al., 2009). In Deutschland entstanden im Jahr 2004 aufgrund von ischämischen Schlaganfällen Gesundheitskosten in Höhe von 7,1 Mrd. Euro (Kolominsky-Rabas et al., 2006). Die indirekten Kosten und psychosozialen Folgen für Betroffene und Angehörige finden in dieser Berechnung keine Berücksichtigung und sind ebenfalls als schwerwiegend zu betrachten.

1.1.5 Klinik

Die zerebrale Minderperfusion hat im Ischämiebereich den neuronalen Zelltod zur Folge, der sich als Funktionsausfall der betroffenen Hirnareale manifestiert (Diener et al., 2008). Je nach Lokalisation und Ausmaß des Infarktes kommt es zu unterschiedlichen klinischen Krankheitsbildern. In der Regel ist der Symptombeginn akut, seltener auch protrahiert (Mumenthaler, 2008). Typische Symptome sind Paresen, Gefühlsstörungen, Sprach- und Sprechstörungen sowie kognitiven Störungen. Zudem können Bewusstseinsstörungen, Atemstörungen und Symptome des erhöhten intrakraniellen Drucks auftreten (Gleixner, 2008).

1.1.6 Pathophysiologie

1.1.6.1 Zerebrale Perfusion

Das Gehirn, das nur etwa 2% des Gesamtkörpergewichtes ausmacht, verbraucht etwa 15% des Herzminutenvolumens (Mumenthaler, 2008). Unter physiologischen Bedingungen metabolisieren die Gehirnzellen Glukose in aerober Glykolyse, um ihren Energiehaushalt zu decken (Mumenthaler, 2008).

Da das Gehirn keine Substratspeicher besitzt, ist es auf eine ausreichende Perfusion und somit kontinuierliche Zufuhr von Glukose und Sauerstoff angewiesen (Berlit, 2013). Durch autoregulatorische Mechanismen wird sichergestellt, dass die zerebrale Perfusion bei arteriellen Blutdruckschwankungen innerhalb bestimmter Grenzen konstant bleibt (Markus, 2004). Bei einem Abfall des arteriellen Blutdrucks kommt es kompensatorisch zur Dilatation von Hirnarteriolen (Mumenthaler, 2008). Die Hirndurchblutung nimmt daher erst bei einem systolischen Blutdruck unter 70mmHg (bzw. 70% des Ausgangswertes bei Patienten mit arterieller Hypertonie) signifikant ab (Berlit, 2013). Im gesunden Organismus wird das Gehirn mit 58ml Blut pro 100g Gewebe versorgt (Mumenthaler, 2008). Symptome einer Ischämie treten auf, wenn die Perfusion unter 22ml Blut pro 100g Gewebe abfällt (Mumenthaler, 2008).

1.1.6.2 Zerebrale Ischämie

Erfolgt die Perfusion mit weniger als 22ml Blut pro 100g Gewebe, ist zunächst ausschließlich der Funktionsstoffwechsel der Nervenzellen beeinträchtigt (Mumenthaler, 2008). Es handelt sich also um eine relative Ischämie. Hält dieser Zustand an und das Blutangebot sinkt weiter auf 10ml pro 100g Gewebe, kann der Strukturstoffwechsel der Zelle nicht länger aufrechterhalten werden und es kommt zum Zelltod bzw. Infarkt (Gleixner, 2008). Die Gewebzone, die sich zwischen Ischämieschwelle und Infarzierungsschwelle befindet, wird als Penumbra bezeichnet (Berlit, 2013). Dieser Hirnbereich ist funktionsgestört und gefährdet durch den Zelltod, kann aber prinzipiell durch eine Reperfusionstherapie gerettet werden (Mumenthaler, 2008).

Das Resultat der zerebralen Ischämie ist eine Unterversorgung des Nervengewebes mit Sauerstoff und Glukose (Markus, 2004). Die anaerobe Glykolyse kann jedoch nicht über einen längeren Zeitraum toleriert werden, da die Energieausbeute geringer ist und es zusätzlich zur einer Anhäufung von Laktat mit resultierendem pH Abfall kommt (Hennes et al, 1999). Aus der Azidose und dem ATP Mangel des Gewebes resultiert die Zerstörung der Membranpermeabilität und des Membranpotentials (Hennes et al, 1999). Es

kommt schließlich zum Einstrom von Wasser in die Zelle und damit zum zytotoxischen Hirnödem (Siesjö et al, 1992). Folge des Hirnödems ist eine Erhöhung des intrazerebralen Drucks, die eine weitere Minderung des lokalen zerebralen Perfusionsdrucks bewirkt. Es folgt eine Kaskade metabolischer Schritte, die schließlich zur strukturellen Schädigung der Zelle führt (Ankarcrona et al, 1995).

1.1.6.3 Zelltod

Der Zelluntergang kann bei zerebraler Ischämie in Form von Nekrose oder Apoptose auftreten. Die Nekrose ist ein passiver Vorgang, bei dem es innerhalb von 12-24 Stunden nach Ischämie zum Zelltod kommt, da die Zellstruktur irreversibel geschädigt ist (Deetjen et al., 2005). Von Nekrose sind selten einzelne Zellen betroffen, sondern häufig ganze Zellverbände (Graham et al, 1997). Von Nekrose ist bei einem Schlaganfall der Teil des Gehirns betroffen, der akut mit Sauerstoff und Glukose unterversorgt ist (Mumenthaler, 2008). Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein physiologischer Vorgang innerhalb der Zelle, der dem Schutz des Zellverbandes oder Gesamtorganismus dient (Deetjen et al., 2005). Hiervon sind häufig Zellen betroffen, deren Metabolismus initial nach Ischämie noch erhalten ist. Mit zeitlicher Verzögerung von Stunden bis Tagen kommt es zu diskreten Umbauvorgängen in der Zelle. Somit sind besonders Zellen im Bereich der Penumbra durch Apoptose gefährdet (Graham et al, 1997). Die Aktivierung der Apoptose läuft innerhalb der Zelle in Kaskaden ab und kann auf intrinsischem und extrinsischem Wege erfolgen (Broughton et al, 2009).

1.1.6.4 Inflammation

Der rapide Verlust neuronaler Zellen im Infarktareal und die damit verbundene Freisetzung von Zytokinen, die mit Zellschaden assoziiert sind, bewirkt eine lokale Entzündungsreaktion (Jablonska et al, 2011). Diese Inflammation ist ein kritischer Mediator des zerebralen Schadens, wie tierexperimentelle und klinische Studien belegen (Gerhard et al, 2000, Schilling et al, 2003, Jablonska et al, 2010, Vandeputter et al, 2010, Jablonska et al, 2011). Die post-

ischämische Entzündungsreaktion verläuft in Kaskaden, wobei insbesondere die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten von Bedeutung ist (Markiewicz et al, 2006, Thornton et al, 2008, Feeney et al, 2009, Zhao et al, 2010).

In klinischen Studien wurden Anzeichen von Entzündungsreaktionen außerhalb des Zentralen Nervensystems als Folge der zerebralen Ischämie gefunden. Im peripheren Blut von Infarktpatienten steigt die Zahl der Leukozyten als einer der ersten Entzündungsreaktionen an. Im Gehirn verursachen die Leukozyten die Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren (Stevens et al, 2002, Hurn et al. 2007, Jablonska et al, 2010, Jablonska et al, 2011).

1.1.7 Neuroregeneration

1.1.7.1 Neurogenese

Unter Neuroregeneration wird die Fähigkeit des Nervensystems verstanden, verlorene Nervenzellfunktionen zu ersetzen. Bestandteil der Neuroregeneration sind die Neurogenese, die Dendritogenese und die Angiogenese.

Neurogenese bezeichnet die Bildung neuer Nervenzellen aus einer teilungsfähigen neuronalen Stammzelle oder Vorläuferzelle (Kempermann et al, 1997). Lange Zeit wurde angenommen, dass diese im adulten Gehirn von Säugetieren nicht mehr stattfindet. Ausschließlich während der Embryogenese, so die allgemeine Lehrmeinung, käme es zur Bildung neuer Nervenzellen. Bei Schädigung des Gehirns beispielsweise durch Ischämie sei eine Regeneration damit nicht möglich (Ramón y Cajal et al, 1928).

In den 1960er Jahren gelang es erstmals, in adulten Rattengehirnen Neurogenese im Bereich des Gyrus dentatus des Hippocampus und im Bulbus olfaktorius zu belegen (Altmann et al, 1965).

Der definitive Nachweis der Neurogenese konnte durch Neueinführung von Techniken wie der BrdU-Markierung erbracht werden. Hierbei handelt es sich um eine Methode zum Nachweis von Mitoseaktivität in Zellen mithilfe des Thymidinanalogs BrdU (Bromodesoxyuridin). Es wurden hauptsächlich in zwei Regionen des Gehirns neuronale Stammzellen nachgewiesen, in der Subventrikulärzone der lateralen Ventrikel und im Gyrus dentatus des Hippocampus (Eriksson, 1998). Diese Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich

unbegrenzt teilen zu können und sie sind außerdem in der Lage, Tochterzellen zu generieren, die sich zu Neuronen oder Gliazellen weiter-differenzieren können (Eriksson, 1998). Adulte Neurogenese konnte auch bei Säugetieren einschließlich des Menschen nachgewiesen werden (Eriksson et al, 1998).

Neuronalen Stammzellen, aus denen neuronale Vorläuferzellen hervorgehen, sind selbsterneuernde, multipotente Zellen (Taupin et al, 2006, Xiong et al, 2010). Unter physiologischen Bedingungen sterben Neurone im Gyrus dentatus des Hippocampus kontinuierlich ab, während die Vorläuferzellen proliferieren und diese ersetzen, so dass die Zellzahl des Hippocampus konstant bleibt (Gage et al, 2000, Xiong et al, 2010). Gleichzeitig ersetzen die neu-entstandenen Zellen der Subventrikulärzone die abgestorbenen Zellen des Bulbus olfactorius (Xiong et al, 2010).

Die adulte Neurogenese, ausgehend von der Hippocampusregion sowie der Subventrikulärzone, unterliegt der Regulation durch endogene und exogene Faktoren (Kuhn et al, 1996). Zu den Faktoren zählen sowohl das Lebensalter, aber auch der Einfluss von Hormonen, Wachstumsfaktoren, sowie Umwelteinflüsse wie Stress, körperliche Aktivität und Traumata (Gould et al, 1997, Gould et al, 1998, van Praag et al, 1999, Galea et al, 2008).

Im Zentralen Nervensystem befinden sich neurovaskuläre Einheiten (NVUs), die multi-zelluläre Komplexe darstellen, bestehend aus Endothelzellen, Neuronen, Gliazellen sowie Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrixproteine, die eine physikalische Nähe zum Endothel aufweisen. In diesen NVUs stehen aus neuronalen Stammzellen entstandene Neurone in engem Zusammenhang mit Umbauprozessen an Gefäßen (Xiong et al, 2010). Somit sind neuroregenerative Prozesse wie Angiogenese und Neurogenese eng verknüpft (Xiong et al, 2010).

1.1.7.2 Neurogenese nach ischämischem Hirninfarkt

Experimentelle Schlaganfallstudien konnten zeigen, dass eine zerebrale Ischämie die Zellproliferation und Neurogenese in der Subventrikulärzone stimuliert (Jink et al, 2001, Arvidsson et al, 2002, Kernie et al, 2010). Während ältere Untersuchungen noch nahelegten, dass die Neurogenese nach einem

Schlaganfall von kurzer Dauer sei (Jink et al, 2001, Arvidsson et al, 2002, Kernie et al, 2010), belegen neuere Arbeiten eine gesteigerte Neurogenese über einen Zeitraum von vier Monaten (Thored et al, 2006, Kernie et al, 2010) beziehungsweise einem Jahr nach Ischämie (Osman et al, 2011).

Neuronale Stammzellen aus der Subventrikulärzone wandern normalerweise zum Bulbus olfaktorius durch kettenähnliche Formationen. Nach zerebraler Ischämie hingegen kommt es dazu, dass ein großer Teil dieser Zellen stattdessen zum ischämischen Striatum wandert, so dass die Migration zum Bulbus olfaktorius reduziert ist (Arvidsson et al, 2002, Jin et al, 2003, Ohab et al, 2006, Yamashita et al, 2006, Kernie et al, 2010). Obwohl viele Neuroblasten in das ischämische Striatum wandern, scheinen nur wenige davon zu Neuronen zu reifen (Kernie et al, 2010). Der Großteil dieser neuentstandenen Neurone stirbt in einem frühen Entwicklungsstadium ab (Arvidsson et al, 2002); möglicherweise infolge von lokaler Inflammation oder aufgrund mangelnder Fähigkeit, sich in Zellverbände zu integrieren (Kernie et al, 2010).

Ein Zusammenhang zwischen gesteigerter Neurogenese nach Ischämie und verbesserter funktioneller Erholung wird seit langem angenommen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Neurogenese die funktionellen Beeinträchtigungen nach Ischämie bei Mäusen verschlechtert (Jin et al, 2010). Eine gesteigerte Neurogenese verbessert langfristig die funktionelle Erholung nach Ischämie im Rattenmodell, laut einer aktuellen Studie (Ortega et al, 2013).

1.1.8 Therapie

1.1.8.1 Akuttherapie

Die Akuttherapie von ischämischen Hirninfarkten beinhaltet verschiedene Behandlungskonzepte. Unterschieden werden muss zwischen der spezifischen Behandlung, die eine kausale Therapie darstellt und begleitenden Maßnahmen, die zwar prognoseverbessernd sind, jedoch nicht die Ursache des Schlaganfalls behandeln (Leitlinien der Deutschen Schlaganfallgesellschaft, 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten von der Behandlung auf einer Spezialstation, einer sogenannten Stroke Unit profitieren, da Morbidität und Mortalität gesenkt werden (Heuschmann et al, 2004). Zu den durchgeführten

begleitenden Maßnahmen zählen die Überwachung und Therapie entgleister Vitalparameter.

Ziel der spezifischen Therapie von Schlaganfällen ist es, die Rekanalisation des verschlossenen Gefäßabschnittes zu erzielen. Dabei kann unterschieden werden zwischen lokaler mechanischer Rekanalisation mittels Katheter, systemischer venöser thrombolytischer Therapie, lokaler intraarterieller thrombolytischer Therapie und ultraschallgestützter Thrombolyse.

Die intravenöse thrombolytische Therapie mit recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) ist innerhalb eines schmalen Zeitfensters von viereinhalb Stunden nach Symptombeginn in Deutschland als einzige der genannten Therapien zugelassen. Es hat sich in vielen Studien gezeigt, dass durch die intravenöse Thrombolyse eine wirksame Revaskularisation betroffener Gefäßabschnitte und damit Reperfusion von Hirngewebe möglich ist (Marler et al, 1995, Hacke et al, 1999, Kohrmann et al, 2007). Aufgrund des Zeitfensters und der zahlreichen Kontraindikationen sowie des Risikos für lyse-induzierte Blutungen, ist die Thrombolyse nur für eine kleine Patientengruppe zugänglich. Derzeit erhalten etwa 10% der Infarktpatienten eine Thrombolyse (Minnerup et al, 2011).

1.1.8.2 Sekundärprophylaxe

Ziel der Therapie nach einem Schlaganfall ist es, individuelle Risikofaktoren des Patienten so zu reduzieren, dass Schlaganfallrezidive vermindert werden können. Dabei kommt der Behandlung der arteriellen Hypertonie sowie der Hyperlipidämie eine besondere Bedeutung zu (Leitlinien der Deutschen Schlaganfallgesellschaft). Zusätzlich profitieren Schlaganfallpatienten von einer Thrombozytenaggregationshemmung (European Stroke Organisation, 2008). Neben der medikamentösen Risikoreduktion sollte eine Umstellung des Lebenswandels angestrebt werden. Gesunde Ernährung, körperliche Bewegung und Karenz von Alkohol und Nikotin sind dabei von besonderer Bedeutung.

Die Sekundärprävention von Schlaganfällen muss bei jedem Patienten individuell erwogen werden. Liegen pathologische Befunde vor, die

modifizierbar sind und den Patienten für weitere Schlaganfälle gefährden, sollten diese behoben werden.

1.1.8.3 Rehabilitation

Nach erfolgter Notfallbehandlung eines Schlaganfallpatienten erfolgen bereits Maßnahmen der neurologischen Frührehabilitation. Im Anschluss der kurativmedizinischen Therapie erfolgt die eigentliche Rehabilitation in Form einer Anschlussheilbehandlung. Besonders erfolgreich ist dabei die Behandlung des Patienten durch eine interdisziplinäre Gruppe von Experten, mit dem Ziel ein hohes Maß an Selbständigkeit für den Patienten zu erreichen (Knecht, et al, 2011).

1.2 Schlaganfall im Tiermodell

1.2.1 Anforderungen an ein Schlaganfallmodell

Ziel eines Schlaganfallmodells ist es, den menschlichen Schlaganfall möglichst gut widerzuspiegeln, damit die erhobenen Daten möglichst gut vom Tiermodell auf den Menschen übertragbar sind. Die Läsion, die erzeugt wird, sollte sowohl der eines spontan entstandenen menschlichen Schlaganfalls ähneln, als auch hinsichtlich der Pathophysiologie vergleichbar sein. Um Schlaganfälle von Versuchstieren untereinander vergleichen zu können, sollte das Modell reproduzierbare Läsionen verursachen. Das Modell sollte durch äußere Faktoren möglichst wenig beeinflussbar und einfach in der Durchführung sein. Es existiert eine Vielzahl verschiedener Ischämie Modelle, die die beschriebenen Anforderungen in unterschiedlichem Maße erfüllen. Es kann zunächst zwischen globalen und fokalen Ischämie Modellen unterschieden werden.

Globale Ischämie Modelle werden eingesetzt um Gehirnschäden zu erzeugen, die aufgrund von Herz-Kreislaufstillstand eintreten. In diesen Modellen wird eine Ischämie des gesamten Gehirns erzeugt.

Fokale Ischämie Modelle eignen sich gut, Schlaganfälle bei Menschen experimentell darzustellen. Je nach Modell wird eine Teilschädigung des

Gehirns durch verschiedene Mechanismen erzeugt, ähnlich einem spontan entstandenen Schlaganfall. Zu den bedeutendsten fokalen Ischämie-Modellen zählen das Modell der MCAO (middle cerebral artery occlusion) und die Photothrombose, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

1.2.2 Fadenokklusionsmodell

Das Modell der MCAO (middle cerebral artery occlusion), im deutschen Sprachgebrauch auch als Fadenokklusionsmodell bekannt, wird durch Verschluss der Arteria cerebri media ausgelöst (Tamura et al, 1981, Chen et al, 1986). Es gibt auch die Möglichkeit einer distalen reversiblen MCAO mittels eines Fadenmodells (Koizumi et al, 1985). Die Reperfusion erfolgt nach einer definierten Zeitspanne, indem der Faden zurückgezogen wird. Die Folge der Minderperfusion ist ein großer Ischämiebereich, der sich häufig über die komplette Hemisphäre erstreckt. Das MCAO Modell imitiert die Pathophysiologie des Schlaganfalls gut. Die Reproduzierbarkeit des Modells ist jedoch eingeschränkt, da die Infarktgröße bei den Tieren häufig stark variiert, zum Beispiel aufgrund von anatomischen Gefäßvariationen. Eine häufige Komplikation der MCAO ist eine subarachnoidale Blutung, die leicht durch Gefäßperforation beim Verschieben des Fadens auftreten kann. Somit ist die Mortalität der Versuchstiere erhöht, was die Möglichkeit für Langzeituntersuchungen erschwert.

1.2.3 Photothrombose

Beim Modell der Photothrombose werden mithilfe der photosensitiven Substanz Bengal Rose fokale Thromben in kortikalen Endästen von zerebralen Gefäßen hervorgerufen (Watson et al, 1985). Durch gezielte Bestrahlung mit Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge kommt es zur Bildung von Sauerstoffradikalen. Durch diese Bildung von freien Radikalen kommt es zu einem Endothelschaden, der die Thrombozytenaggregation anregt. Der hierdurch entstehende Thrombus verursacht einen Gefäßverschluss (Watson et al, 1985). Dieses wenig invasive Verfahren ermöglicht es, Infarkte in beliebigen Regionen des Kortex auszulösen. Das Modell der Photothrombose zeichnet sich dadurch

aus, dass die Technik einfach ist und wenige Komplikationen auftreten. Die erzeugten Infarkte sind sehr gut reproduzierbar, weshalb die einzelnen Tiere besonders vergleichbar sind (Ginsberg et al, 1989). Ein weiterer Vorteil dieses Modells für die vorliegende Arbeit ist die niedrige Mortalität und Morbidität der Versuchstiere. Dadurch sind frühe Verhaltenstests sowie Langzeituntersuchungen im Bezug auf die Regeneration nach Ischämie erst möglich.

1.3 Ghrelin

1.3.1 Physiologische Funktionen von Ghrelin

Ghrelin ist ein Peptidhormon, das im Magen gebildet wird. Zahlreiche Studien haben seine Bedeutung für die Nahrungsaufnahme, die Regulation des Körpergewichtes und den Glukosehaushalt demonstriert (Date et al, 2000, Peino et al, 2000, Van der Lely et al, 2004, Kojima et al, 2005). Diese Effekte werden hauptsächlich durch eine hohe Expression des Ghrelinrezeptors (GHSR1a) im Hypothalamus vermittelt. Da dieser Rezeptor außerdem noch in zahlreichen anderen extra-hypothalamischen neuronalen Populationen expremiert wird, scheint es naheliegend, dass Ghrelin andere physiologische Funktionen, neben der Beteiligung am Metabolismus, aufweist. Zu diesen extra-hypothalamischen Funktionen zählen Einflüsse auf Lernen und Gedächtnis, Belohnung und Motivation, Angst und Depression sowie Neuroprotektion (Zane et al, 2011).

1.3.2 Pharmakologie von Ghrelin

Ghrelin wird aus seiner Vorstufe dem Pre-Pro-Ghrelin durch Proteolyse und posttranslationale Acetylierung gebildet. Synthese und Überführung in seine aktive Form durch das Enzym Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) erfolgen hauptsächlich im Magen (Kojima et al, 1999). Im Plasma kommt Ghrelin in acetylierter und des-acetylierter Form vor. Bekannt ist, dass acetyliertes Ghrelin seine Wirkung durch Bindung an den GHSR1a Rezeptor entfaltet. GHSR1a ist ein transmembranöser Rezeptor, der durch Aktivierung eines G-Proteins zur Freisetzung von Wachstumshormon führt. Ein Rezeptor, an den des-acyliertes

Ghrelin bindet, konnte bislang nicht identifiziert werden, so dass die Wirkungsmechanismen von des-acyliertem Ghrelin bislang unbekannt sind (Zane et al, 2011).

Neuroprotektive Effekte konnten sowohl bei acetylierten als auch bei des-acetyliertem Ghrelin nachgewiesen werden, so dass die des-acetylierte Form nicht ausschließlich als inaktive Vorstufe gelten kann (Chung et al, 2008).

1.3.3 Neuroprotektion und Neuroregeneration durch Ghrelin

Studien, die den Effekt von Ghrelin auf Lernen und Gedächtnis zum Gegenstand hatten, konnten zeigen, dass Plasma-Ghrelin die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und sich im Bereich des Hippocampus anreichert, wo es an Neurone bindet (Diano et al, 2006).

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Ghrelin neuroprotektive Effekte aufweist (Chung et al. 2007, Zane et al, 2011). Untersuchungen, die den Einfluss von Ghrelin auf fokale Ischämie zum Gegenstand hatten, wurden durchgeführt. Anhand der Therapie ischämischer Schlaganfälle bei Ratten konnten signifikante neuroprotektive Effekte von Ghrelin nachgewiesen werden (Zane et al, 2011). Ghrelin reduziert das Infarktvolumen und den resultierenden Zelltod. Bei Zellen, die mit Ghrelin vorbehandelt wurden, kann die Induktion zur Apoptose verhindert werden (Chung et al, 2007, Mio et al, 2007, Hwang et al, 2009). Verminderte Aktivierung von Caspase und Cytochrome C sowie erhöhter Anteil von Bcl-2/BAX zählen zu den anti-apoptotischen Effekten von acetyliertem Ghrelin (Chung et al, 2007).

Der Einfluss von Ghrelin auf die Mechanismen der Neurogenese unter physiologischen Bedingungen war Gegenstand von Studien. Untersucht wurde dabei die Stimulation der Neurogenese durch Ghrelin in dorsalen motorischen Kerngebieten des Nervus vagus (Zhang et al, 2004) bei Ratten sowie die Neurogenese im Hippocampus der Maus (Moon et al, 2009). Neben direkten Effekten von Ghrelin werden außerdem noch indirekte Effekte angenommen. Möglicherweise stimuliert Ghrelin die Sekretion von Wachstumshormon aus der Hypophyse (Castaneda et al, 2010) und bewirkt damit eine gesteigerte

Sekretion von Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in der Leber (Zane et al, 2011), das seinerseits die Neurogenese anregt (Torres-Aleman et al, 2010). Während die beschriebenen Arbeiten zur Neurogenese an gesunden Tieren durchgeführt wurden, ist bislang nicht bekannt ob Ghrelin jenseits der neuroprotektiven Effekte auch die Regeneration geschädigter Neurone nach fokaler Ischämie fördert.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, neuroregenerative Effekte von Ghrelin nach fokaler zerebraler Ischämie zu untersuchen. Hierfür wurden Ratten verwendet, bei denen eine Therapie mit Ghrelin 24 Stunden nach Ischämie begonnen wurde. Es wurde untersucht, ob die Therapie mit Ghrelin Einfluss auf die Regeneration sensomotorischer Funktionen hat. Gegenstand der Arbeit war außerdem, die Wirkung von Ghrelin auf die endogene Neurogenese als strukturelles Korrelat sensomotorischer Funktion zu untersuchen.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Bei den verwendeten Tieren handelt es sich um adulte männliche Wistar Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland), die in einer Tierzucht unter standardisierten Bedingungen aufgezogen wurden. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit europäischen Richtlinien (European Communities Council Directive von 1989) durchgeführt und durch die örtliche Ethikkommission genehmigt. Die Tierhaltung und die Durchführung der Tierversuche erfolgten in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Medizinischen Fakultät Münster. Die Tiere wurden zufällig paarweise eine Woche vor dem Operationsdatum in Käfige gesetzt. Diese Käfige enthielten Holzgranulat und wurden bei einer Raumtemperatur von 23°C einem 12-stündigem Hell-Dunkel-Wechsel und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% untergebracht. Die Tiere hatten freien Zugang zu einem Standardfutter (Altromin 1324, Lage, Deutschland) und zu Trinkwasser. Zur Erstellung von homogenen Tierversuchspopulationen wurden alle Tiere am Operationstag gewogen. Bei Versuchsbeginn hatten die Tiere ein Gewicht von 180-200g.

2.2 Experimentelles Design der Studie

Das experimentelle Design der Studie ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Verhaltensuntersuchungen wurden mit einer Gesamtanzahl von 33 Tieren durchgeführt. Für die Therapie wurden die Versuchstiere in zwei Gruppen randomisiert (Kontrollgruppe n=18, Therapiegruppe n=15). Bei der Durchführung der Verhaltenstests und bei den histologischen Untersuchungen war der Untersucher bezüglich der Therapiegruppen verblindet.

Ein Tier der Therapiegruppe starb vor Therapiebeginn. Zehn Tiere der Kontrollgruppe wurden nach Beendigung der Verhaltensuntersuchungen für eine andere Studie verwendet. Die histologischen Untersuchungen wurden bei

einer Gesamtanzahl von 22 Tieren durchgeführt, (Kontrollgruppe n=8, Therapiegruppe n=14).

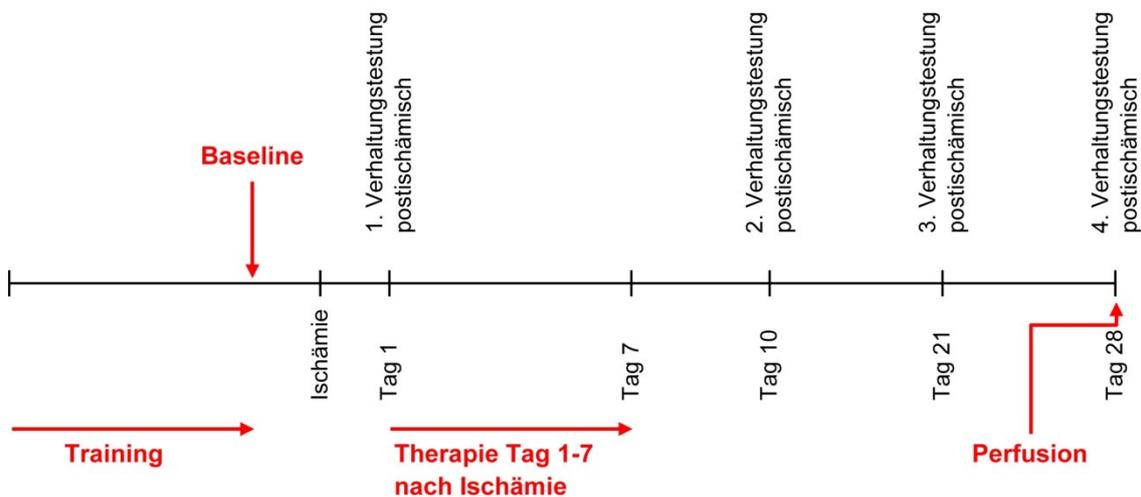


Abbildung 1: Experimentelles Design der Studie

Für die Verhaltensuntersuchungen wurden die Versuchstiere an Untersucher und Umgebung gewöhnt. Es erfolgte eine Trainingsphase, während der die Verhaltensuntersuchungen ohne Wertung der Ergebnisse durchgeführt wurden. Ein Tag vor Ischämieinduktion wurde für die Versuchstiere eine Baseline-Testung durchgeführt. Weitere Verhaltensuntersuchungen erfolgten am ersten postischämischen Tag sowie im Abstand von sieben, zehn und elf Tagen. Im Anschluss an die letzte Verhaltenstestung wurden die Tiere getötet und perfundiert. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Gehirne der Versuchstiere entnommen.

2.3 Sensomotorische Verhaltenstests

Alle Versuchstiere wurden drei Tests unterzogen, dabei war der Untersucher verblindet. Die Verhaltenstestungen wurden während der Helligkeitsphase der Tiere zwischen 7 und 18 Uhr nach einem festen Zeitplan durchgeführt. Die Reihenfolge der Tests veränderte sich nicht. Die Tageszeit des Testens pro Tier blieb gleich, so dass tageszeitliche Einflüsse auf das Verhalten minimiert werden konnten.

Die Tiere wurden an den Untersucher, die Testsituation und Testapparatur langsam gewöhnt, indem sie in die verschiedenen Testapparaturen hineingesetzt wurden, ohne Testdurchführung. Zu Trainingszwecken wurden die Tests zunächst ohne Wertung der Ergebnisse durchgeführt.

Vor der Operation wurden die Tiere an drei aufeinanderfolgenden Tagen durch zwei sensomotorische Tests geprüft (Rota Rod Test, Adhesive Tape Test). Ein

Tag vor der geplanten Operation wurde eine sogenannte Baseline-Testung durchgeführt. Diese beinhaltete neben dem Rota Rod Test und dem Adhesive Tape Test auch den Zylinder Test. Zusätzlich wurden die Tiere im Rahmen der Baseline Testung gewogen.

Die nächste Testung wurde einen Tag nach der Ischämieinduktion vorgenommen und dann noch jeweils 3 Testungen im Abstand von 10 Tagen, 11 Tagen und 7 Tagen. Am Tag 28 wurden die Tiere im Anschluss an die Verhaltensuntersuchungen anästhesiert (siehe 2.4.1) und dekapitiert. Es erfolgte die vorsichtige Entnahme der Gehirne (siehe 2.6).

2.3.1 Rota Rod Test

Der Rota Rod Test wurde durchgeführt, um die motorische Funktion und die Koordinationsfähigkeit während einer Lauftätigkeit zu testen.

Die Versuchstiere wurden auf einen rotierenden Balken gesetzt, auf dem sie gezwungen waren zu laufen (Abb. 2). Dabei drehte sich der Balken um eine horizontale Achse. Der Balken war durch Plastikscheiben in verschiedene Bereiche abgetrennt. Die Geschwindigkeit der Umdrehung wurde konstant erhöht von anfänglich 4 auf 40 Umdrehungen pro Minute über einen Zeitraum von 5 Minuten. Die Schwierigkeit für die Tiere bestand darin, die Laufgeschwindigkeit zu beschleunigen, so dass sie nicht von dem Balken herunterfielen. Sobald sie heruntergefallen waren und den Boden berühren, wurde ein Mechanismus ausgelöst, der die Zeitmessung anhielt und die Messung somit beendete.

Es wurden pro Tier drei Messungen durchgeführt. Das Ergebnis wurde dann gemittelt und als Testwert dokumentiert. Für jedes Tier wurde präoperativ eine Baseline ermittelt.



Abbildung 2: Rota Rod Test

Das Versuchstier ist gezwungen, sich mit dem rotierenden Balken zu bewegen, um nicht hinunter zu fallen. Die Zeit, die das Tier auf dem Balken verbleibt, wird erfasst.

2.3.2 Adhesive Tape Test

Der Adhesive Tape Test wurde durchgeführt, um sowohl sensorische als auch feinmotorische Funktionen zu messen. Bei diesem Test wurde ein runder Aufkleber mit einem Durchmesser von 1cm auf den proximalen Teil beider Innenflächen der Vorderpfoten (rechts und links) aufgeklebt (Abb. 3). Daraufhin wurde die Zeit gemessen, die die Tiere benötigten, um den Aufkleber von der Pfote zu entfernen. Der Versuch dauerte dabei maximal zwei Minuten.

Der Adhesive Test konnte nur durchgeführt werden, wenn die Tiere mit dem Versuchsaufbau vertraut waren. Deshalb wurden die Tiere an drei aufeinander folgenden Tagen vor der Operation trainiert. Ein Tag vor Induktion der ischämischen Läsion wurde eine Baseline erstellt. Für die Baseline erfolgten drei Messungen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde.



Abbildung 3: Adhesive Tape Test

Der Untersucher befestigt die Aufkleber an den Pfoteninnenflächen des Versuchstieres. Gemessen wird die Zeit, die das Tier jeweils für das Entfernen des Aufklebers benötigt.

2.3.3 Zylinder Test

Der Zylinder Test ist ein Test, der die sensomotorische Funktion und die Koordination misst. Zur Durchführung des Tests wurde ein Tier in einen Glaszylinder (Durchmesser von 16cm, Höhe von 20cm) gesetzt. Der Zylinder stand auf einem Glastisch von 72cm Höhe (Abb.4). Während des Tests wurde das Tier durch eine Videokamera gefilmt, die sich unter dem Tisch befand. Nach dem das Tier in den Zylinder gesetzt wurde, dokumentierte die Kamera für drei Minuten wie sich das Tier verhielt. Ziel des Untersuchers war es, zu erreichen, dass sich das Tier unbeobachtet fühlte. Bei der Auswertung des Tests wurde anhand eines festgelegten Protokolls, das unten (2.10.1) näher erklärt wird, der Pfotenkontakt des Versuchstiers mit dem Glaszylinder ausgewertet.



Abbildung 4: Zylindertest

Das Versuchstier sitzt in einem Zylinder, der auf einem Glastisch steht. Unter dem Tisch befindet sich die Videokamera, die das Verhalten des Tieres dokumentiert. Die Häufigkeit der Vorderpfotenberührungen mit der Wand des Zylinders wird gezählt.

2.4 Ischämieinduktion

Der in Narkose durchgeführte Eingriff hatte das Ziel, durch Photothrombose eine ischämische Läsion im Cortex der Ratte zu erzeugen. Die photochemische Induktion von Thromben wurde durch die photosensitive Substanz Bengal Rose unter gleichzeitiger Laserapplikation erzielt. Diese Substanz wurde dem Versuchstier intravenös verabreicht. Die Laserbestrahlung führte zur Bildung von Sauerstoffradikalen. Die dadurch erzielte mikrovaskuläre Thrombozytenaggregation hatte die Entstehung von Thromben zur Folge.

2.4.1 Narkose

Die Narkose bei den Versuchstieren wurde durch eine intraperitoneale Injektion von 0,3ml einer Lösung aus Ketaminhydrochlorid (100mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (8mg/kg Körpergewicht) erreicht. Die Narkosetiefe wurde so gewählt, dass die Tiere spontan atmeten. Bei Bedarf wurde die Narkose durch 0,2ml der Narkoselösung vertieft. Nach Beendigung aller operativen Maßnahmen erfolgte die Narkoseausleitung. Diese erfolgte unter kontinuierlicher Temperaturkontrolle mittels rektaler Sonde und Heizplatte. Die Tiere wurden anschließend paarweise in ihre Käfige zurückgesetzt.

2.4.2 Intraoperative Lagerung

Die Narkosetiefe wurde mittels Kornealreflex überprüft. Bei ausreichend tiefer Narkose wurden die Tiere in der Leistenregion rasiert. Danach wurden die Tiere mittels Klebestreifen auf dem Rücken liegend auf einem Temperatur-Regelsystem fixiert. Zur Überprüfung der Körpertemperatur wurde eine rektale Sonde gelegt. Die Körpertemperatur des Tieres wurde bei 37-37,5°C konstant gehalten. Um die Augen der Tiere vor Austrocknung zu schützen, wurde eine Bepanthen Salbe aufgetragen.

2.4.3 Einsetzen eines Katheters in die Vena femoralis

Nach Hautdesinfektion und Abdecken der rechten Leiste der Versuchstiere erfolgte ein 1,0cm langer Hautschnitt. Es folgte die Präparation des subkutanen Fett- und Bindegewebes sowie die schonende Darstellung der Femoralgefäße. Nach der Eröffnung der Vena femoralis wurde ein Polyethylenkatheter (Fine Bore Polythene Tubing, Innendurchmesser 0,58mm, Außendurchmesser 0,96mm) 2-3cm in die Vene vorgeschoben und mit Fäden befestigt. Über den Femoraliskatheter konnte später das Bengal Rose appliziert werden.

Nachdem die Photothrombose erfolgt war, wurde der Katheter entfernt. Zur Verhinderung eines größeren Hämatoms wurde die Punktionsstelle kurzfristig behutsam komprimiert. Es folgte eine fortlaufende Hautnaht mittels nicht resorbierbarem, monofilem chirurgischen Nahtmaterial (4-0 Prolene).

2.4.4 Induktion der photothrombotischen Läsion

Nach Hautdesinfektion und sterilem Abdecken des Kopfes, wurde ein sagittaler Hautschnitt in der Mittellinie des Schädels von 3cm Länge gesetzt. Anschließend wurde das Bregma anterior freipräpariert und stereotaktisch ein Punkt 0,5mm anterior und 3,5mm rechts lateral der Mittellinie markiert.

Die Versuchstiere wurden stereotaktisch fixiert und eine Laserlichtquelle auf den zuvor markierten Punkt positioniert. Es wurde Bengal Rose Farbstoff (0,133ml/kg Körpergewicht und 10mg/ml 0,9% NaCl-Lösung) über einen Zeitraum von zwei Minuten in den Femoraliskatheter injiziert. Dabei wurde der markierte Punkt mit einem Laserstrahl von 8mm Durchmesser (G Laser Technologies) für 20 Minuten bestrahlt. So wurde eine photochemische Ischämie im parietalen Kortex erzeugt.

Der Hautverschluss am Kopf erfolgte mittels nicht resorbierbarem, monofilem chirurgischen Nahtmaterial (4-0 Prolene).

2.5 Therapie

Die Versuchstiere wurden zufällig zwei Gruppen zugeteilt:

Gruppe I: Kontrollgruppe n=18 0,5ml 0,9%ige NaCl-Lösung

Gruppe II: Therapiegruppe n=15 Behandlung mit 50µg Ghrelin in 0,5ml 0,9% NaCl-Lösung

Die Tiere der Therapiegruppe wurden an 10 aufeinander folgenden Tagen mit Ghrelin behandelt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten an den 10 Tagen NaCl-Lösung. Dabei erfolgte die erste Injektion 24h nach Ischämie. Unter Verwendung einer sterilen Kanüle (BD Mikrolance 3 Nr. 18) erfolgte die Injektion in dorsokranieler Richtung durch die Bauchdecke in die Bauchhöhle.

2.6 BrdU-Markierung

Den Versuchstieren beider Gruppen wurde an zehn aufeinanderfolgenden Tagen 0,5ml Bromdesoxyuridinlösung (BrdU) intraperitoneal verabreicht. Dabei erfolgte die erste Injektion 24h nach Ischämie. Unter Verwendung einer sterilen

Kanüle (BD Mikrolance 3 Nr. 18) erfolgte die Injektion in dorsokranieler Richtung durch die Bauchdecke in die Bauchhöhle.

2.7 Präparation der Gehirne

Nach Beendigung der Therapie und der sensomotorischen Verhaltenstests wurden die Tiere an Tag 28 erneut in bereits beschriebener Weise anästhesiert und im Anschluss perfundiert. Dafür wurden die Tiere thorakotomiert, das Perikard eröffnet und eine Knopfkanüle über die Herzspitze bis in die Aorta ascendens vorgeschoben und dort fixiert. Das rechte Herzohr wurde eröffnet, um das Tier ausbluten zu lassen. Gleichzeitig wurde über die Knopfkanüle das Gefäßsystem mit 0,9% NaCl-Lösung durchgespült. Nach fünf Minuten wurde über die Kanüle Paraformaldehyd-Lösung (PFA) infundiert, um das Gehirngewebe zu fixieren.

2.8 Gewinnung der Gewebeproben

Nach Kraniotomie und Entnahme der Gehirne wurden diese fünf Minuten auf Trockeneis schockgefroren und anschließend in PFA gelagert. Nach 24 Stunden wurden die Gehirne für drei Tage in 30% Succhrose-Lösung gegeben. Anschließend wurden die Gehirne erneut auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert. Mithilfe eines Cryostaten wurden $40\mu\text{m}$ breite Frontalschnitte im Free-Floating-Verfahren erstellt. Ein Teil der Schnitte wurde direkt auf gläserne Objektträger aufgezogen, der andere Teil in Tissue cryoprotectant solution (TCS) gelagert. Das Gehirn eines Versuchstiers wurde dafür in folgender Weise geschnitten: Die ersten fünf Schnitte wurden jeweils in ein TCS gefüllten Behälter (tube) gegeben, dann wurden zwei Schnitte auf Objektträger aufgezogen. In gleicher Weise wurden die dann folgenden Schnitte auf tubes bzw. Objektträger verteilt. Die aufgezogenen Schnitte und die in TCS gelagerten Schnitte wurden eingefroren und bei -30°C gelagert.

2.9 Färbung der Gewebeproben

Es wurden drei verschiedene Färbungen zur histologischen Untersuchung der Gewebeschnitte durchgeführt. Dafür wurde pro Tier und Färbung jeweils der Inhalt eines zuvor beschriebenen Tubes verwendet. Der Untersucher war zu jeder Zeit verblindet.

2.9.1 Toluidinfärbung

Bei der Toluidinfärbung handelt es sich um eine unspezifische immunhistochemische Färbung. Sie wurde durchgeführt, um die unterschiedlichen Infarkt volumina der Versuchstiere darzustellen. Die Färbung mit Toluidinbau wurde an aufgezogenen Schnitten an einem Tag durchgeführt. Eine Ausführliche Beschreibung der Durchführung erfolgt im Färbeprotokoll.

2.9.2 BrdU/ NeuN Färbung

Es wurde eine Kombinationsfärbung aus Bromdesoxyuridin (BrdU) und Neuronal Nuclear Protein (NeuN) durchgeführt. Die Schnitte wurden einem Fluoreszenzmarker für NeuN und einem Fluoreszenzmarker für BrdU-positiven Zellen ausgesetzt. Diese Marker besitzen sekundäre Antikörper, die durch unterschiedliche Wellenlängen angeregt werden. Dies kann mittels eines Fluoreszenzmikroskopes dargestellt werden.

Die BrdU/NeuN Färbung wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Für die Doppelimmunfluoreszenzfärbung wurden die Free-Floating-Schnitte mit Blocking Reagenz geblockt und anschließend mit dem Antikörper: RBrdU über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dann die Inkubation mit dem Antikörper NeuN über Nacht bei 4°C. Die gefärbten Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen. Eine Ausführliche Beschreibung der Durchführung erfolgt im Färbeprotokoll.

2.9.3 DCX Färbung

Die Doublecortin (DCX) Färbung wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Free-Floating-Schnitte mit donkey Blocking Reagenz geblockt und im Anschluss mit goat

anti-DCX Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am zweiten Tag folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper BgoaRb sowie die Zugabe des Farbstoffs. Die gefärbten Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen. Eine Ausführliche Beschreibung der Durchführung erfolgt im Färbeprotokoll.

2.10 Auswertung

2.10.1 Auswertung der Verhaltensuntersuchungen

Für den Rota Rod Test wurde an den jeweiligen Tagen der Testung pro Tier drei Messungen durchgeführt. Aus den drei Messungen wurde ein Mittelwert gebildet. Es wurde gemessen wie lange das jeweilige Versuchstier auf dem Rota Rod lief.

Für den Adhesive Tape Test wurden pro Versuch und Tier von jeder Pfote drei Messungen durchgeführt. Aus den Ergebnissen dieser Messungen wurde für jede Seite ein Mittelwert errechnet. Aus den Mittelwerten beider Seiten wurde ein Asymmetrie Score nach folgender Formel berechnet: $\text{Zeit bis zum Entfernen des Aufklebers der ipsilateralen Pfote} - \text{Zeit bis zum Entfernen des Aufklebers der kontralateralen Pfote} / \text{Zeit bis zum Entfernen des Aufklebers der kontralateralen Pfote} + \text{Zeit bis zum Entfernen des Aufklebers der ipsilateralen Pfote}$.

Die Auswertung des Zylindertests erfolgte durch Analyse des entstandenen Filmmaterials. Es wurde körperseitengetrennt gezählt, wie häufig ein Versuchstier die Wand bzw. den Boden des Zylinders mit der jeweiligen Vorderpfote berührt hat. Aus den Summen wurde nach folgender Formel ein Verhältnis gebildet: $\text{Kontralateraler Vorderpfotenkontakt} - \text{ipsilateraler Vorderpfotenkontakt} / \text{Kontralateraler Vorderpfotenkontakt} + \text{ipsilateraler Vorderpfotenkontakt}$. Aus den ermittelten Werten wurde eine Ratio ermittelt nach der Formel: $(re-li) / (li+re)$. Diese berücksichtigt, ob ein Tier postischämisch eine Extremitätenseite bevorzugt.

2.10.2 Auswertung der Histologie

Die mit Toluidinblau gefärbten Schnitte wurden in zehnfacher Vergrößerung fotografiert. Die digitalisierten Photographien der Schnitte wurden mit Hilfe des Computerprogramms Scion image analysis software (Imaging Research Inc., St Catharines, Ontario, Canada) ausgewertet. Dafür wurde zunächst die Infarktfläche aller Schnitte eines Versuchstiers ermittelt. Aus der Infarktfläche wurde dann das Infarktvolumen berechnet (Infarktfläche x Schnittdicke x Schnittintervall).

Für die Auswertung der BrdU/NeuN gefärbten Gehirnschnitte wurden BrdU positive Zellen in der Subventrikulärzone und im Bereich des Gyrus dentatus des Hippocampus beider Hemisphären untersucht. Dafür wurden die BrdU-positiven Zellen stereologisch gezählt. Um den Anteil der Neurone unter den BrdU-positiven Zellen zu ermitteln, wurden 20 zufällig ausgewählte BrdU-positiv Zellen auf ihre Positivität auf NeuN untersucht. Die Multiplikation der Gesamtanzahl BrdU-positiver Zellen mit dem prozentualen Anteil von NeuN/BrdU-doppelpositiven Zellen ergab die Zahl der neuentstandenen Neuronen.

Die Ergebnisse der Zählungen aller histologischen Schnitte aus der Hippocampusregion bzw. aus der Subventrikulärzone eines Versuchstieres wurden addiert. Aus den Zellzahlen der Tiere einer Gruppe wurde für die Hippocampusregion und die Subventrikulärzone je ein Mittelwert errechnet.

Für die Auswertung der DCX Färbung wurden DCX-positive Zellen in der Subventrikulärzone und im Bereich des Gyrus dentatus des Hippocampus beider Hemisphären untersucht. Die DCX-positiven Zellen wurden dafür in beiden Hirnbereichen stereologisch gezählt. Im Bereich der Subventrikulärzone traten die DCX-positiven Zellen in Clustern auf, so dass einzelne Zellen nicht voneinander abzugrenzen waren. Es war somit nicht möglich, die DCX gefärbten Schnitte im Bereich der Subventrikulärzone quantitativ auszuwerten. Die DCX Färbung im Bereich der Subventrikulärzone wurde aus der Wertung genommen.

Die Ergebnisse der Zählungen aller histologischen Schnitte der Hippocampus-region eines Versuchstieres wurden addiert. Aus den Zellzahlen der Tiere einer Gruppe wurde ein Mittelwert errechnet.

2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Signifikanz der Verhaltensuntersuchungen erfolgte durch zweifache ANOVA mit Messwiederholungen, sowie durch t-Tests als post-hoc-Test. Die Daten aus den histologischen Untersuchungen wurden anhand von zweiseitigen Student's t-Tests durchgeführt. Für die statistischen Analysen wurde die Software Statistical Package for Social Sciences (SPSS 15.0 für Windows) verwendet. Unterschiede wurden als signifikant gewertet, wenn das Signifikanzniveau eine vorgegebene Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ unterschritt.

2.12 Färbeprotokolle und Materialien

2.12.1 Toluidinfärbung

a) Färbeprotokoll:

- Auftauen und Trocknung der Schnitte für 20 Minuten bei Zimmertemperatur
- Waschen in PBS 3 Mal für 5 Minuten
- Färbung mit gefilterter 0,7% Toluidinlösung für 10 Minuten
- Waschen mit Aqua dest. 3 Mal für 1 Minute
- Differenzierung mit 70% Alkohol für 2 Minuten
- Differenzierung mit 90% Alkohol für 1 Minute
- Zugabe von HistoClear für 1 Minute
- Trocknung bei Zimmertemperatur
- Eindeckeln mit Roti Histofitt

b) Materialien:

- PBS = Phosphate-gepufferte Saline
- Roti Histofitt der Firma Roth

2.12.2 BrdU/ NeuN Färbung

a) Färbeprotokoll – Tag 1:

- Waschen in PBS 3 Mal für 5 Minuten
- Denaturierung der DNA:
 - 50% Formamide/ 2 Mal SSC 2h bei 60°C
 - 2 Mal SSC 2 Mal 5 Minuten bei 60°C
 - 2N HCl 30 Minuten bei 60°C
- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Vorbehandlung mit 0,1M Borate Puffer, pH 8,5
- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Blocken mit Blocking Reagenz (BR) für 30 Minuten
- Zugabe des 1. Antikörpers RBrdU in BR (Verhältnis 1:500) bei 4°C über Nacht

a) Färbeprotokoll – Tag 2:

- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Zugabe von BgaR in BR (Verhältnis 1:500) für 1h
- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Zugabe von Farbstoff A594 in BR (Verhältnis 1:500) für 1h
(nach Zugabe des Farbstoffs müssen die weiteren Schritte abgedunkelt durchgeführt werden)
- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Zugabe des 2. Antikörpers NeuN in BR (Verhältnis 1:200) bei 4°C über Nacht

a) Färbeprotokoll – Tag 3:

- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Zugabe von 488GaM in BR (Verhältnis 1:200) für 1h
- Waschen in PBS 3 Mal für 10 Minuten
- Aufziehen der Schnitte auf Objektträger
- Eindeckeln der Objektträger mit Mounting Medium mit Dapi

b) Materialien:

- SSC:
 - 800ml H₂O
 - 17,5g NaCl
 - 8,82g Sodium Citrat
 - auf 1L mit H₂O auffüllen
 - pH 7,0
- Blocking Reagenz:
 - 12ml PBS
 - 120µL 10% Triton X
 - 480 µL Goat Serum
- Borat Puffer 0,1M:
 - 3,8g Sodiumborat
MW381
 - 100ml Aqua dest.
 - pH 8,5
- RBrdU des Herstellers abcam
- BGaR (Biotin Goat anti Rat) des Herstellers abcam
- Anti NeuN, clone A60 des Herstellers Millipore
- 488GaM (Goat anti Mouse) des Herstellers abcam
- A 594 Steptoavidin Alexa Fluor 594 conjugate des Herstellers Invitrogen

Die Bromdesoxyuridinlösung wurde täglich direkt vor der Applikation frisch hergestellt. Dazu wurde die abgemessene sterile 0,9%ige NaCl-Lösung im Wasserbad auf 37°C erwärmt und das abgewogene, tiefgekühlte BrdU-Pulver des Herstellers Sigma-Aldrich darin gelöst (30 mg/ml).

2.12.3 DCX Färbung

a) Färbeprotokoll – Tag 1:

- Waschen in PBS 3 Mal für 5 Minuten
- Blocken mit Blocking Reagenz für 15 Minuten
- Zugabe des 1. Antikörpers (DCX) in BR (Verhältnis 1:500) bei 4°C über Nacht

a) Färbeprotokoll – Tag 2:

- Waschen in PBS 3 Mal für 5 Minuten
- Zugabe des 2. Antikörpers (BgoaRb) in BR (Verhältnis 1:100) für 45 Minuten

- Waschen in PBS 3 Mal für 5 Minuten
- Zugabe des Farbstoffs AV 594/ AV 488 in BR (Verhältnis 1:100) für 45 Minuten
- Aufziehen der Schnitte auf Objektträger
- Eindeckeln der Objektträger mit Mounting Medium mit Dapi

b) Materialien:

- Blocking Reagenz:
 - 1% Lösung
 - 1g Blocking Reagenz Donkey
 - 100ml Maleinsäurepuffer pH 7,5
- DCX Antibody des Herstellers abcam
- BgaRb (Biotin Goat anti Rabbit) des Herstellers vector
- A 594 Steptoavidin Alexa Fluor 594 conjugate des Herstellers Invitrogen

3 ERGEBNISSE

3.1 Verhaltensuntersuchungen

3.1.1 Gewichtsverlauf der Tiere

Bei den Tieren aus Kontrollgruppe und Therapiegruppe konnte postoperativ keine Gewichtsreduktion festgestellt werden. Alle Tiere nahmen innerhalb der 28 Tage an Gewicht zu. Abbildung 5 zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede im Gewichtsverlauf von Tieren der Kontrollgruppe und Therapiegruppe festgestellt werden konnten ($p > 0,05$).

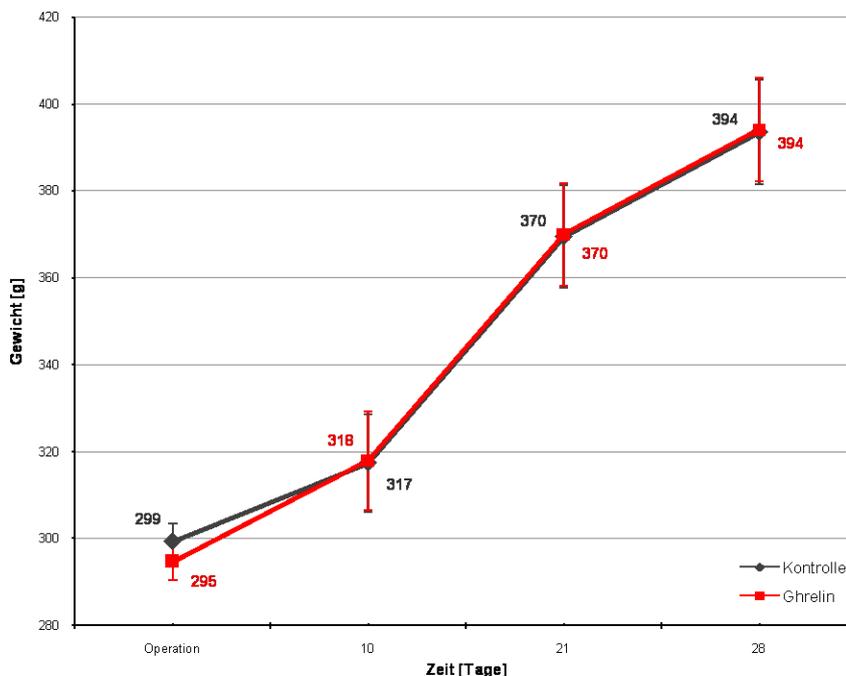


Abbildung 5: Gewichtsverlauf

Die Versuchstiere der Therapiegruppe und der Kontrollgruppe nahmen innerhalb der 28 Tage kontinuierlich an Gewicht zu. Es gab keine Unterschiede zwischen Therapiegruppe und Kontrollgruppe. In den ersten 10 Tagen postischämisch stieg das Gewicht der Versuchstiere nur leicht an. In den weiteren 11 Tagen kam es zu einer größeren Gewichtssteigerung. Im Anschluss flacht die Kurve des Gewichtsverlaufs wieder ab.

3.1.2 Rota Rod Test

Bei statistischer Analyse der Leistungen beider Gruppen, konnten keine signifikanten Effekte der Therapie im Rota Rod Test gefunden werden.

Abbildung 6 veranschaulicht einen postoperativen Leistungsabfall beider Versuchsgruppen. Im weiteren Verlauf zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe.

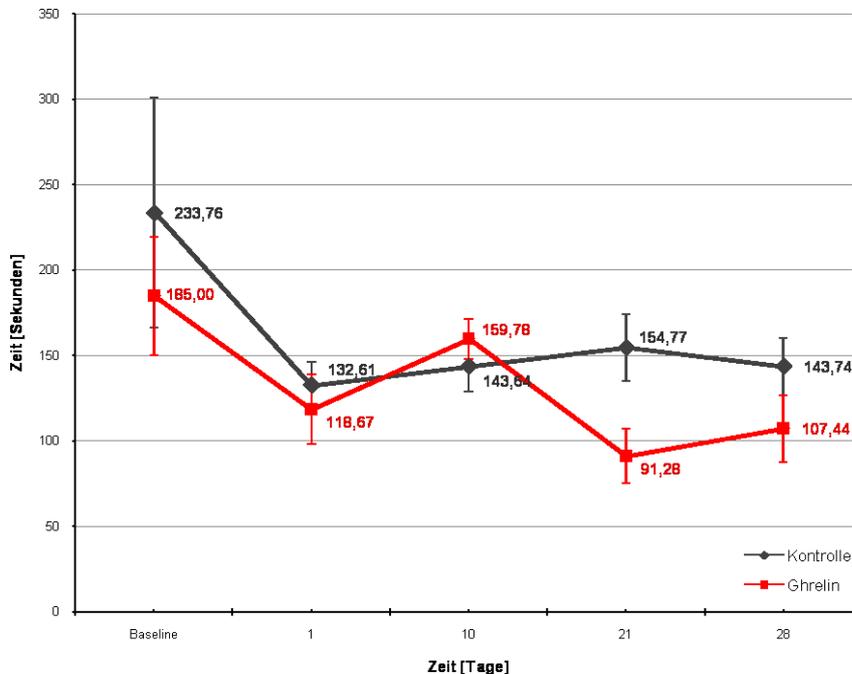


Abbildung 6: Rota Rod Test

Postischämisch zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine Verschlechterung der Leistungen im Rota Rod Test. Die Ergebnisse der Baseline-Testung konnten nicht mehr erreicht werden. Es gab keine signifikanten Unterschiede beider Gruppen.

3.1.3 Adhesive Tape Test

Die Versuchstiere beider Gruppen erzielten präoperativ in der Baseline vergleichbare Ergebnisse. Postoperativ verschlechterten sich die Tiere beider Gruppen (Abb. 7). An den Versuchstagen 10 und 21 zeigten sich sowohl bei Kontrollgruppe als auch bei Therapiegruppe kontinuierliche Verbesserungen der Leistung im Adhesive Tape Test. Die Leistungen der Therapiegruppe, die insgesamt eine ausgeprägtere Verbesserung zeigte, stiegen von Tag 21 auf Tag 28 weiter an, während die Leistungen der Kontrollgruppe stagnierten. Die ANOVA mit Messwiederholung war signifikant für die Faktoren Behandlungsgruppe $F(1,30): 16,291$; $p \leq 0,001$) und Durchgang $F(1,30): 51,173$; $p \leq 0,001$), jedoch nicht für die Interaktion Durchgang und Behandlungsgruppe.

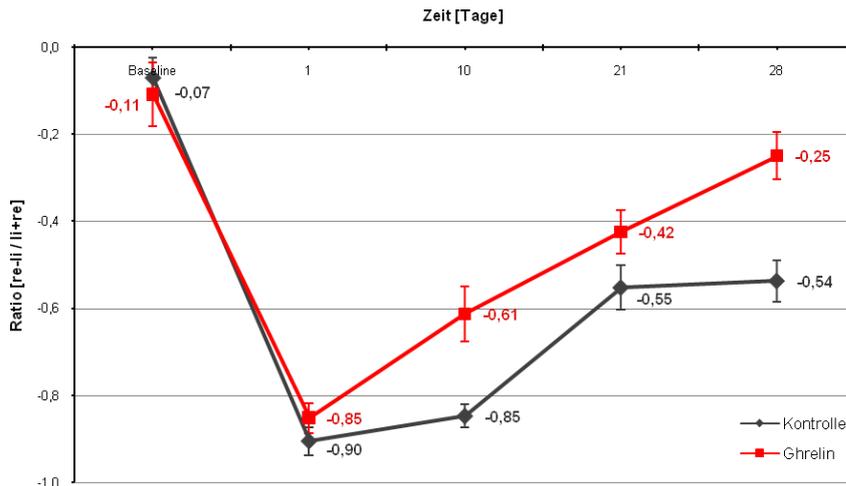


Abbildung 7: Adhesive Tape Test

In der Baseline Testung erreichten die Tiere beider Gruppen vergleichbare Ergebnisse. Bei allen Versuchstieren kam es postischämisch zu einer deutlichen Verschlechterung der Leistungen. Bei den Tieren beider Gruppen zeigten sich an den weiteren Untersuchungstagen Verbesserungen. Dabei verbesserten sich die Tiere der Ghrelin Gruppe kontinuierlich während sich die Tiere der Kontrollgruppe von Tag 21 bis zu Tag 28 nicht erneut verbesserten. Die Leistung der mit Ghrelin behandelten Tiere war signifikant besser als die der Placebotiere ($p < 0,05$).

3.1.4 Zylindertest

Ausgehend von der Baseline, bei der die Tiere in Kontrollgruppe und Therapiegruppe vergleichbare Ergebnisse erzielten, zeigte sich am Tag 1 postoperativ eine starke Abnahme der Leistung in beiden Gruppen (Abb. 8). In der Kontrollgruppe lag die Ratio bei -0,4 und in der Therapiegruppe bei -0,38. An Tag 10, 21 und 28 zeigte sich sowohl in der Therapiegruppe, als auch in der Kontrollgruppe eine Verbesserung der Leistung im Zylindertest. Die Leistungen der Tiere aus der Therapiegruppe verbesserten sich dabei signifikant stärker, als die der Kontrollgruppe. Die ANOVA mit Messwiederholung war signifikant für die Faktoren Behandlungsgruppe ($F(1,25):7,033$; $p=0,014$) und Durchgang ($F(1,25):10,434$; $p=0,003$), nicht jedoch für die Interaktion Durchgang und Behandlungsgruppe.

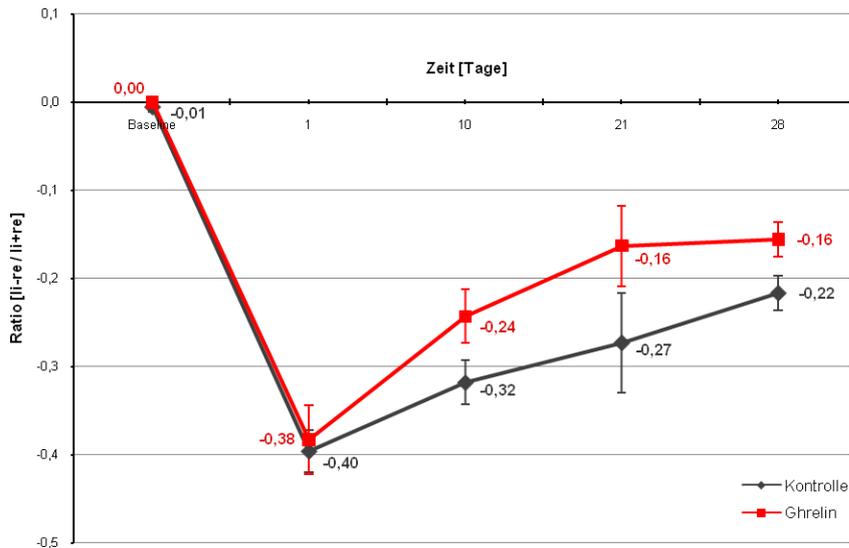


Abbildung 8: Zylinder Test

Die Tiere beider Versuchsgruppen erreichten in der Baseline Testung ähnliche Ergebnisse. Bei allen Versuchstieren kam es postischämisch zu einer ausgeprägten Verschlechterung der Leistungen. In den folgenden Messungen zeigte sich bei den Tieren der Behandlungsgruppe eine signifikante Verbesserung der Leistungen gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

3.2 Histologische Untersuchungen

3.2.1 Toluidinfärbung

Das Infarktvolumen wurde anhand der toluidinblau-gefärbten Schnitte ermittelt. Das Infarktvolumen der Tiere aus der Kontrollgruppe lag im Mittel bei $15,18\text{mm}^3$ und bei den Tieren der Therapiegruppe im Mittel bei $11,71\text{mm}^3$. Damit unterschieden sich die Infarktgrößen der Tiere in der Therapiegruppe und der Kontrollgruppe nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.2.2 BrdU/ NeuN Färbung

Die Anzahl der BrdU-positiven Zellen im Bereich des Gyrus dentatus des Hippocampus zeigte in der Therapiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe einen deutlichen Trend (Bonferroni korrigierter student's t-test $p = 0,051$). Die Zellzahl in der Kontrollgruppe lag im Mittel bei 67,25 und in der Therapiegruppe bei 163,07 (Abb. 9).

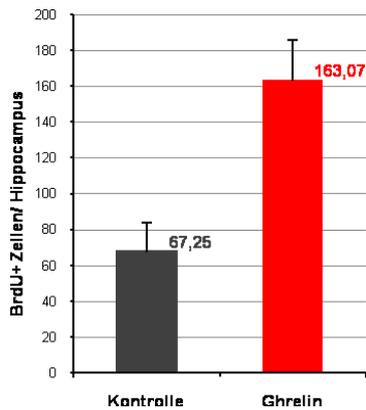


Abbildung 9: BrdU-positiver Zellen in der Hippocampusregion
Die Anzahl der BrdU-positiven Zellen im Bereich des Gyrus dentatus des Hippocampus zeigte in der Therapiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe einen deutlichen Trend.

Im Gyrus dentatus lag Anteil der doppelpositiven Zellen (positiv für BrdU und NeuN) in der Kontrollgruppe bei 53,75% und in der Therapiegruppe bei 80% (Abb. 10, 15 und 16). Die BrdU-positiven Zellen in der Therapiegruppe sind zu signifikant höherem Anteil Neurone als in der Kontrollgruppe (student's t-test korrigiert für multiple Testung $p \leq 0,001$).

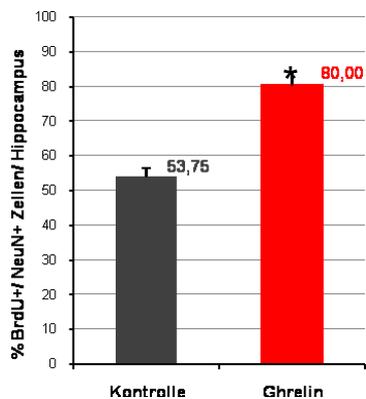


Abbildung 10: Doppelpositive Zellen im Hippocampus
Der Anteil der Zellen in der Hippocampusregion die sowohl BrdU- als auch NeuN-positiv sind, war in der Therapiegruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Die absolute Zahl von Neuronen, die sich aus der Anzahl BrdU-positiver Zellen und dem Anteil der davon NeuN-positiven Zellen ergibt, ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Anzahl der Neurone in der Therapiegruppe war mit 130,46 im Mittel höher, als bei der Kontrollgruppe mit im Mittel 36,15 Neuronen.

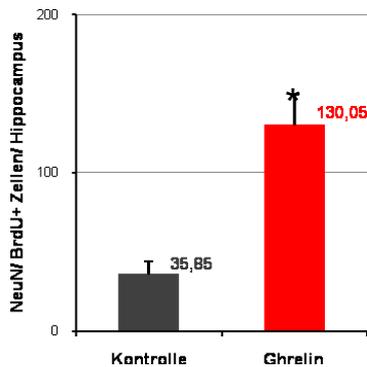


Abbildung 11: Neuentstandene Neurone im Hippocampus

Die Anzahl neuentstandener Neurone in der Hippocampus-region errechnet sich aus dem Anteil der doppelpositiven Zellen. Die Zahl dieser Neurone war in der Ghrelingruppe höher als in der Placebogruppe.

Im Bereich der Subventrikulärzone zeigt sich ebenfalls ein signifikant höherer Anteil BrdU-positiver Zellen in der Therapiegruppe mit im Mittel 391,38, als in der Kontrollgruppe mit im Mittel 93,25 Zellen (student's t-test auf multiple Testungen korrigiert $p=0,002$) (Abb. 12).

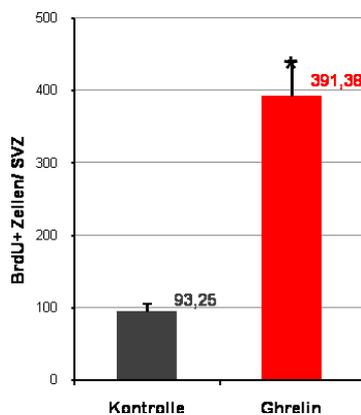
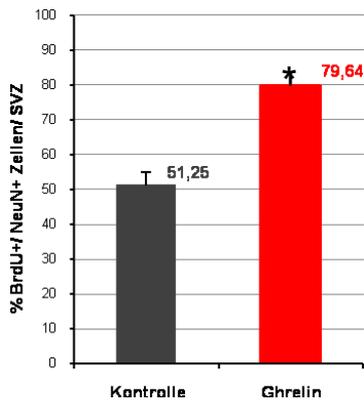


Abbildung 12: BrdU-positive Zellen in der Subventrikulärzone

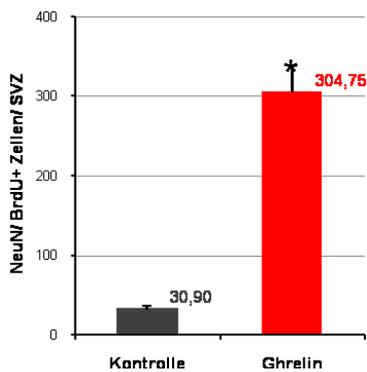
Die Anzahl der BrdU-positiven Zellen war signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Der Anteil der doppelpositiven Zellen lag in der Therapiegruppe bei 79,64% und war signifikant höher als in der Kontrollgruppe, wo er bei 51,25% lag (student's t-test auf multiple Testungen korrigiert $p \leq 0,001$) (Abb. 13).



*Abbildung 13: Doppelpositive Zellen in der Subventrikulärzone
Der Anteil der Zellen in der Subventrikulärzone, die sowohl BrdU- als auch NeuN-positiv sind, war in der Therapiegruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe.*

Aus den Anteilen der doppelpositiven Zellen ergeben sich die absoluten Zahlen von Neuronen. In der Therapiegruppe liegen im Mittel 311,70 Neurone vor und in der Kontrollgruppe im Mittel 47,79 Neurone (Abb. 14).



*Abbildung 14: Neuentstandene Neurone in der Subventrikulärzone
Die sich aus dem Anteil der doppelpositiven Zellen errechnete Zahl neuentstandener Neurone war in der Therapiegruppe höher als in der Kontrollgruppe.*

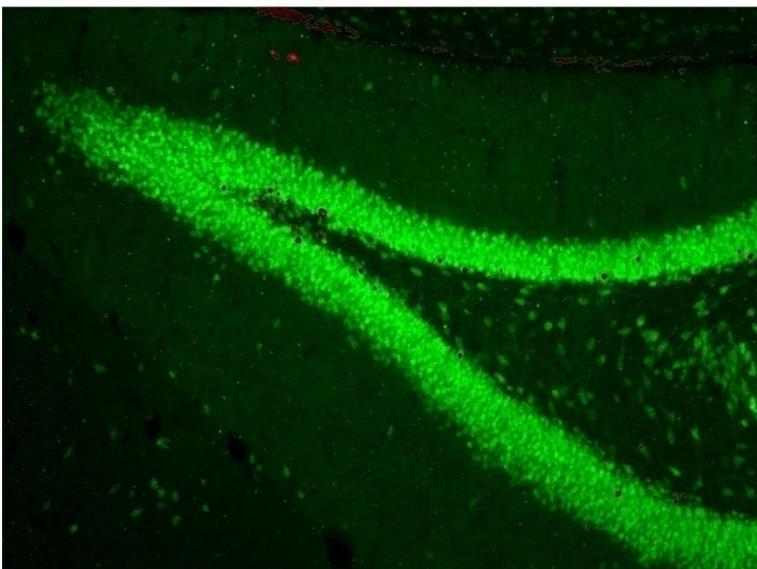
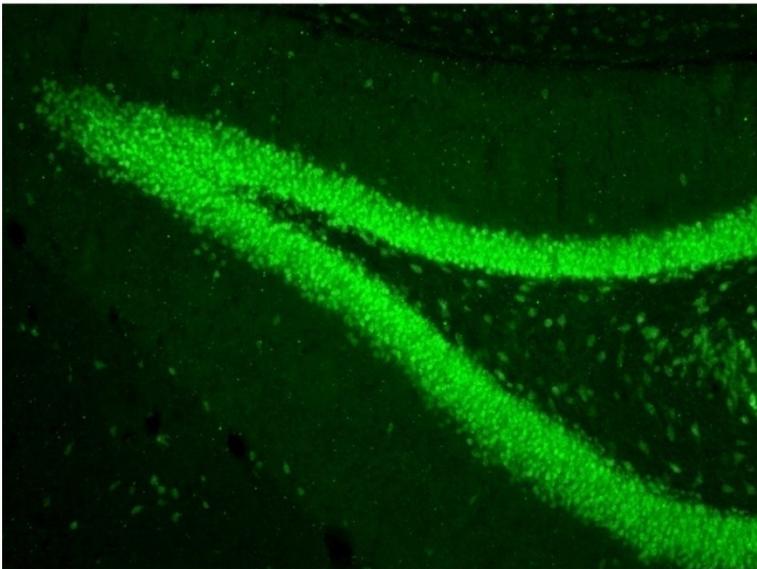
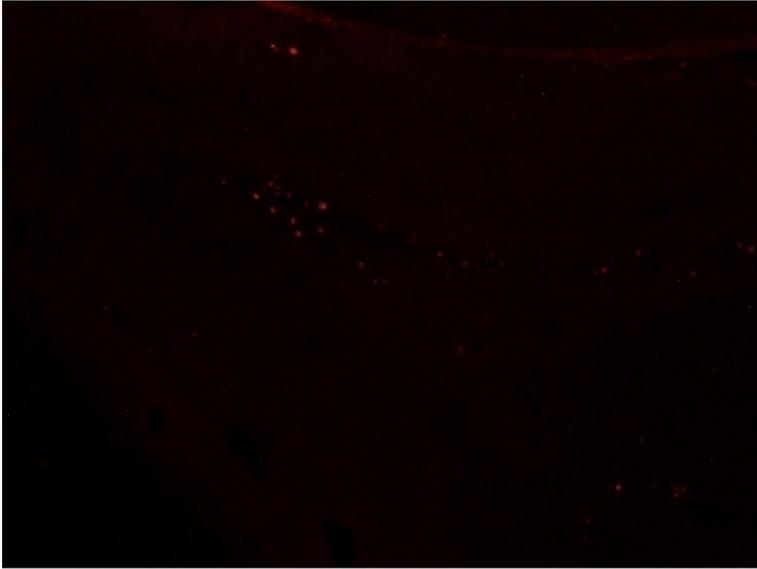


Abbildung 15:

In 40facher Vergrößerung ist die Hippocampusregion dargestellt.

Oben: BrdU-positive Zellen

Mitte: NeuN-positive Zellen

Unten: BrdU- und NeuN-positive Zellen

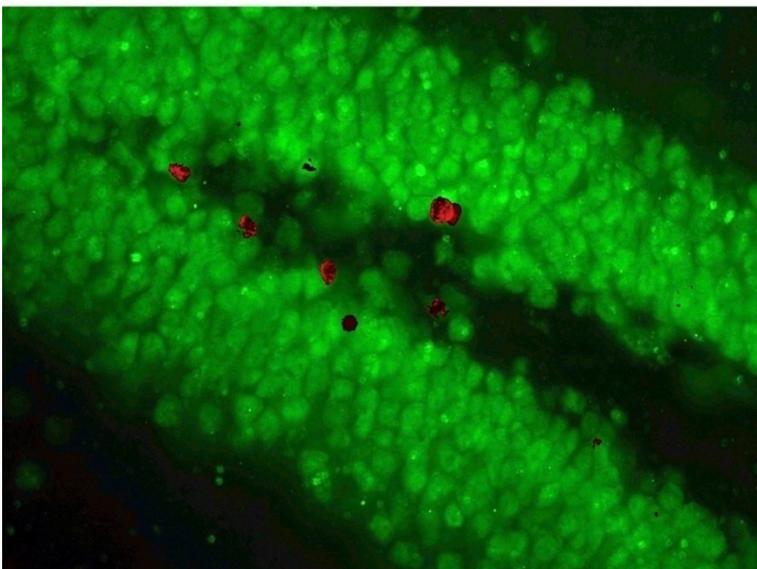
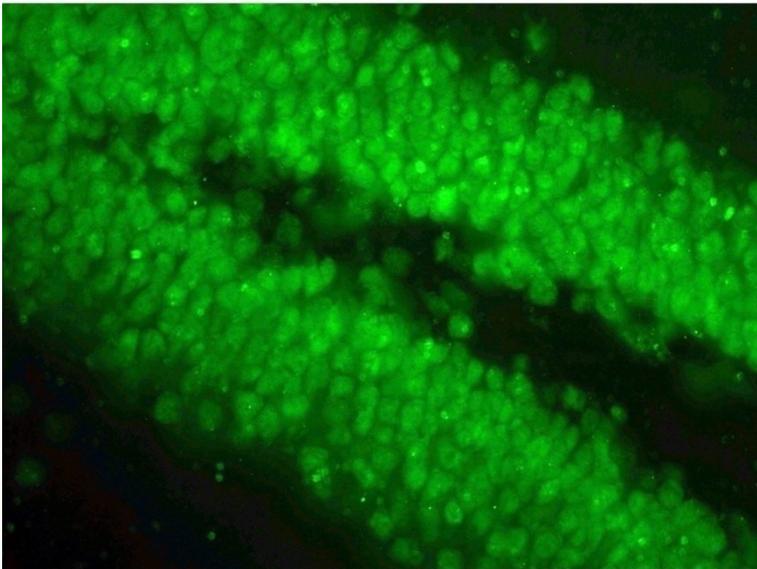
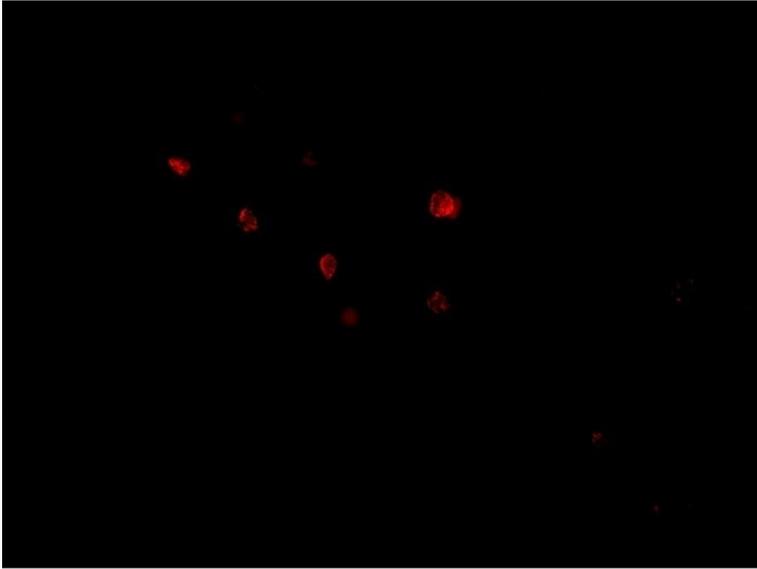


Abbildung 16:

In 100facher Vergrößerung ist die Hippocampusregion dargestellt

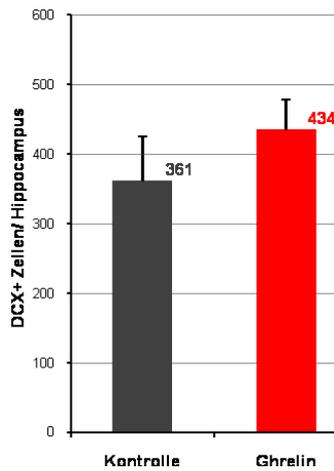
Oben: BrdU-positive Zellen

Mitte: NeuN-positive Zellen

Unten: BrdU- und NeuN-positive Zellen

3.2.3 DCX Färbung

Die Zellzahl der DCX-positiven Zellen im Bereich des Gyrus dentatus des Hippocampus liegt in der Kontrollgruppe im Mittel bei 361 und in der Therapiegruppe bei im Mittel 434. Es zeigt sich keine signifikante Erhöhung der DCX-positiven Zellen in der Therapiegruppe.



*Abbildung 17: DCX-positive Zellen in der Hippocampusregion
Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der DCX-positiven Zellen in der Hippocampusregion von Kontrollgruppe und Therapiegruppe gefunden werden.*

4 DISKUSSION

1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Ghrelin neuroregenerative Effekte auf die funktionelle Erholung im Tiermodell der fokalen Ischämie hat. Es zeigte sich eine signifikant bessere funktionelle Erholung der Tiere der Therapiegruppe gegenüber der Placebogruppe im Adhesive Tape Test und im Zylindertest. Der weniger sensitive Rota Rod Test zeigte keine Unterschiede der beiden Gruppen. Durch die immunhistochemische Färbung BrdU/NeuN konnte im Bereich der Hippocampusregion und der Subventrikulärzone in der Ghrelingruppe eine signifikant gesteigerte Neurogeneserate im Vergleich zur Placebogruppe, als strukturelles Korrelat der verbesserten funktionellen Erholung, nachgewiesen werden.

1.2 Interpretation der Ergebnisse

4.2.1 Verhaltensuntersuchungen und Gewichtsverlauf

Es wurden mehrere Verhaltenstests zur Quantifizierung sensomotorischer Defizite durchgeführt. Im Zylindertest und im Adhesive Tape Test konnten signifikant bessere Leistungen bei den Tieren der Therapiegruppe nachgewiesen werden. Bei den Tieren der Ghrelingruppe waren die gemessenen sensorischen und feinmotorischen Funktionen sowie die Koordination nach Ischämie im Vergleich zur Placebogruppe signifikant besser. Der ebenfalls durchgeführte Rota Rod Test zeigte keine Unterschiede in den beiden Gruppen. Der Grund hierfür ist, dass der Rota Rod Test ein wenig sensitiver Test ist, der vor allem grobe motorische Defizite erfassen kann (Bouet et al 2007). Die durch Photothrombose bedingten, dezenten neurologischen Ausfälle können nur durch sensitive Tests und nicht durch den Rota Rod Test zuverlässig erfasst werden.

Der Gewichtsverlauf der Versuchstiere, der für den Zeitraum der Verhaltensuntersuchungen dokumentiert wurde, ist in Therapiegruppe und Kontrollgruppe nicht unterschiedlich. Somit handelt es sich bei der Verbesserung in den Verhaltenstests nicht um eine unspezifische Wirkung infolge eines verbesserten Allgemeinzustandes durch eine Gewichtszunahme. Die Steigerung der sensomotorischen Funktion ist daher als Ausdruck neuronaler Effekte von Ghrelin anzusehen.

4.2.2 Histologische Untersuchungen

Anhand der Toluidinfärbung wurden die Infarktvolumina der Tiere berechnet, um einen möglichen Behandlungseffekt zu erkennen. Eine kleinere Infarktgröße in der Therapiegruppe könnte Ausdruck einer neuroprotektiven Wirkung sein. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Infarktgröße in den Untersuchungen in den beiden Versuchsgruppen gefunden werden. Grund hierfür ist, dass zum Zeitpunkt der Applikation von Ghrelin, 24 Stunden nach Ischämieinduktion, die Größe des Hirninfarktes bereits determiniert und die Penumbra irreversibel geschädigt ist. Dies spricht wiederum dafür, dass die Effekte von Ghrelin auf die sensomotorische Erholung auf eine echte Neuroregeneration und nicht auf eine neuroprotektive Wirkung zurückzuführen sind. Die endogene Neurogenese wurde durch die immunhistochemischen Färbungen BrdU/NeuN und DCX untersucht. Durch die BrdU/NeuN Färbung konnte sowohl in der Hippocampusregion als auch in der Subventrikulärzone eine signifikant erhöhte Neurogeneserate in der Therapiegruppe festgestellt werden. Es konnte eine höhere Anzahl BrdU-positiver, also sich neugebildeter, Zellen gefunden werden, die außerdem zu signifikant höherem Anteil neuronaler Herkunft waren. Die DCX Färbung hingegen konnte keine signifikant höhere Anzahl DCX-positiver Zellen in der Therapiegruppe zeigen.

Diese Ergebnisse stehen jedoch, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Expressionsmuster der untersuchten neuronalen Marker, nicht im Widerspruch zueinander. BrdU ist ein Proliferationsmarker, der, hinsichtlich der Markierung sich teilender Zellen, vor allem den Zeitraum widerspiegelt in dem es appliziert wird und nicht den Zeitpunkt, an dem das Versuchstier getötet wurde

(Kempermann et al, 2003). In der vorliegenden Studie wurden somit durch die BrdU Färbung Zellen dargestellt, die postischämisch innerhalb des Applikationszeitraums von sieben Tagen nach Photothrombose entstanden sind. Die BrdU/NeuN-doppeltpositiven Zellen sind demnach adulte Neurone, die im Zeitraum von sieben Tagen nach Ischämie entstanden sind und an Tag 28, zum Zeitpunkt der Perfusion, noch vital waren. DCX hingegen wird während adulter Neurogenese in proliferierenden und post-mitotischen neuronalen Vorläuferzellen transient exprimiert (Brown et al, 2003, Karl et al, 2005). Die Freisetzung von DCX wird durch die Bildung von Neuroblasten hervorgerufen. In der zweiten Woche nach Zellneubildung ist die Expression am höchsten, wird dann aber herunterreguliert. Mit dem Auftreten von adulten Neuronen sinkt die Anzahl von DCX-positiven Zellen (Karl et al, 2005). Die DCX-positiven Zellen, die zum Zeitpunkt der Perfusion nachgewiesen werden konnten, repräsentieren die Zellen, die im Zeitraum von 14 Tagen vor Perfusion neu entstanden sind. Die Zellen hingegen, die während der Behandlung mit Ghrelin gebildet wurden, können 21 Tage nach Beendigung der Therapie nicht mehr als DCX-positive Zellen nachgewiesen werden.

1.3 Literaturkontext

Die neuroprotektiven Eigenschaften von Ghrelin sind in mehreren experimentellen Studien belegt (Chung et al, 2007, Hwang et al, 2009, Cheyuo et al, 2011). Verschiedene Ischämie Modelle der Ratte konnten nachweisen, dass intravenös oder intraperitoneal appliziertes Ghrelin neuroprotektive Effekte aufweist (Chung et al, 2007, Hwang et al, 2009, Cheyuo et al, 2011), also Infarkt volumen reduziert. Neuroprotektive Mechanismen von Ghrelin, die den Untergang der Penumbra verhindern, sind nicht für die positiven Effekte, die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurden, verantwortlich, wie oben angeführt.

Eine tierexperimentelle Arbeit, die den Effekt von Ghrelin im MCAO Model der Ratte untersuchte, zeigte signifikante Ergebnisse unmittelbar vor MCAO sowie nach zwei Stunden Ischämie zum Zeitpunkt der Reperfusion. (Chung et al,

2007). In der gleichen Studie konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Ghrelin Zelltod und Apoptose, die aufgrund von Sauerstoff- und Glukosemangel entstanden sind, reduziert (Chung et al, 2007). Die Entstehung radikaler Sauerstoffmetabolite wird gehemmt und das Membranpotential von Mitochondrien wird stabilisiert (Chung et al, 2007). In einer weiteren Arbeit wird beschrieben, dass sowohl Ghrelin als auch desacetyliertes Ghrelin kortikale Neurone vor einer Ischämie schützt (Hwang et al, 2009). In dieser Arbeit wurde Ratten 30 Minuten vor MCAO Ghrelin in acetylierter bzw. desacetylierter Form intraperitoneal verabreicht. Vierundzwanzig Stunden nach Reperfusion wurden die Gehirne entnommen und histologisch untersucht. Es wurde eine Reduktion des Infarkt Volumens in beiden Therapiegruppen gefunden. Außerdem wurde eine Hemmung der Hochregulation von Prostate apoptosis response-4 (Par-4), einem proapoptotischen Gen, das bei fokaler Ischämie überexprimiert wird, nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass Ghrelin den durch Ischämie verursachten Anstieg von Bax Protein in Mitochondrien hemmt, die zytosolische Konzentration von Bcl-2 Protein erhöht und so die Bcl-2/Bax Ratio anhebt. Es wurde auch ein reduzierter Anstieg von Caspase-3 festgestellt.

Cheyuo und Kollegen, die den Effekt von Ghrelin auf zerebrale Ischämie und die Rolle des Nervus vagus untersuchten, konnten antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte sowie gehemmte nNOS Aktivität nachweisen. Ratten wurde dafür unmittelbar nach MCAO bzw. MCAO und beidseitiger Vagotomie Ghrelin verabreicht. Vierundzwanzig Stunden nach Ischämie und an den folgenden sechs Tagen wurden neurologische Defizite erfasst und anschließend die Gehirne entnommen. Die Tiere der Behandlungsgruppe zeigten signifikant weniger neurologische Defizite und reduzierte Infarkt volumina. Proinflammatorische Moleküle wie TNF- α , Il-6, nNOS und Matrixmetalloproteinase waren in der Therapiegruppe signifikant weniger exprimiert. Desweiteren fanden Cheyuo und Kollegen deutlich reduzierte Effekte der Ghrelinbehandlung nach beidseitiger Vagotomie und konnten damit zeigen, dass die Wirkung von Ghelin durch den Nervus vagus vermittelt wird (Cheyuo et al, 2011).

Inflammatorische Prozesse werden unter anderem dafür verantwortlich gemacht, dass sich nach Ischämie neuentstandene Neurone nicht ausreichend in bestehende Zellverbände einfügen können und so frühzeitig sterben (Dennes et al, 2009). Wird durch Behandlung mit Ghrelin lokale Inflammation gehemmt, könnte dies das vermehrte Überleben von neuentstandenen Neuronen in der Therapiegruppe der vorliegenden Arbeit erklären.

Die zuvor beschriebenen neuroprotektiven Eigenschaften von Ghrelin sind in der vorliegenden Arbeit nicht der Mechanismus für die Wirksamkeit von Ghrelin, da der Therapiebeginn jenseits des neuroprotektiven Zeitfensters lag. Die Verhaltensdaten und die morphologischen Daten zur Neurogenese lassen den Schluss zu, dass der Verbesserung regenerative Mechanismen zugrunde liegen. Aktuelle Studien zeigen, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen gesteigerter Neurogenese und funktioneller Erholung nach einem Schlaganfall besteht (Jin et al, 2010). Die gezielte Hemmung der Neurogenese führt zu einer Zunahme sensomotorischer Ausfälle nach Ischämie (Jin et al, 2010). Dieses Erkenntnis bildet die Grundlage für eine mögliche therapeutische Intervention in die Neurogenese zur Verbesserung der Regeneration.

Bislang wurden erhöhte Neurogeneseraten in dorsalen Motorneuronen des Nervus vagus nach Behandlung mit Ghrelin bei gesunden Tieren nachgewiesen (Zhang et al, 2004). In Zellkulturen konnte ferner gezeigt werden, dass Ghrelin die Aufnahme von (3)H-Tymidinen steigert und so eine erhöhte Proliferation von Vorläuferzellen der Hippocampusregion hervorruft (Johansson et al, 2008). Studien an gesunden Mäusen zeigten eine Zunahme von BrdU-positiven Zellen und DCX-positiven Zellen im Bereich des Hippocampus nach achttägiger Gabe von Ghrelin. Außerdem wurde bei Mäusen, die anti-Ghrelin-Antikörper erhalten hatten, eine reduzierte Anzahl dieser Zellen gefunden (Moon et al, 2009). Der Einfluss von Ghrelin auf die Neurogenese nach Schlaganfall war jedoch bisher nicht erforscht.

1.4 Klinische Implikation

Die bislang veröffentlichten Studien zur Ghrelintherapie im Tiermodell der zerebralen Ischämie haben die Erforschung seiner neuroprotektiven Effekte zum Gegenstand. Ziel der Neuroprotektion ist es, Hirnareale, die von Zelltod bedroht sind, zu schützen (Ginsberg et al, 2008). Ähnlich wie bei der Lysetherapie ist aber auch bei neuroprotektiven Behandlungsmethoden die Zeit ein bedeutsamer Faktor (Ginsberg et al, 2008). Der Grund, warum vielen Patienten zurzeit die Lysetherapie verwehrt werden muss, ist, dass sie die Klinik zu spät erreichen. Das Lysefenster besteht nur für wenige Stunden. Ebenso kann angenommen werden, dass eine neuroprotektive Behandlung, die darauf abzielt, die Penumbra zu retten, nur innerhalb eines bestimmten Zeitfensters nach Ischämiebeginn vielversprechend ist. Während in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte, dass neuroprotektive Mechanismen im Tiermodell wirksam sind, konnten klinische Studien dies nicht belegen. In keiner klinischen Studie konnten bisher neuroprotektive Effekte beim Menschen nachgewiesen werden (O'Collins et al, 2006). Diese Erkenntnisse lassen an der Übertragbarkeit der Neuroprotektion auf den menschlichen Schlaganfall zweifeln. Für die Therapie von Schlaganfallpatienten müssen daher neue Therapiekonzepte gefunden werden, die innerhalb eines größeren Zeitraums postischämisch eine Wirkung erzielen und somit auch für eine größere Anzahl von Patienten zugänglich sind.

Da Ghrelin als gastrales Hormon eine körpereigene Substanz ist, kann bei therapeutischer Anwendung eine gute Verträglichkeit angenommen werden. Untersuchungen an Nagern sowie klinische Studien an Menschen konnten belegen, dass Ghrelin die Nahrungsaufnahme fördert und so eine Gewichtszunahme und Adipositas begünstigt (Tschop et al, 2000, Wren et al, 2001). Während einer Fastenperiode bewirken erhöhte Spiegel von Ghrelin gesteigerten Appetit und unterstützen bei anaboler Stoffwechsellage die Auffüllung von Energiespeichern (Tsubone et al, 2005, Andrews et al, 2008, 2010, Nogueiras et al, 2010). Studien an Knockout Mäusen zeigten eine Reduktion von Diät-induziertem Übergewicht in Abwesenheit von Ghrelin (Wortley et al, 2005). Erfolgreiche klinische Anwendung fand Ghrelin aufgrund

seiner steigernden Wirkung auf den Appetit bei Patienten nach Gastrektomie (Takiguchi, 2013). Obwohl Adipositas die Entstehung der Arteriellen Hypertonie, einem Hauptrisikofaktor des Schlaganfalls, begünstigt, ist hinsichtlich der gewichtssteigernden Wirkung für die Therapie des akuten Infarktes nicht von negativen Folgen auszugehen. Vielmehr konnte durch klinische Studien gezeigt werden, dass Adipositas für die funktionelle Erholung sowie für das Überleben nach einem Schlaganfall von Vorteil ist. Dieses Phänomen wird als „Adipositas-Paradox“ bezeichnet (Zaho et al, 2013). Eine mögliche Gewichtszunahme durch Ghrelin könnte also bei einigen Patienten sogar prognostisch günstig sein. Weitere relevante Nebenwirkungen neben der appetitsteigernden Wirkung wurden in klinischen Studien bislang nicht beobachtet (Takiguchi, 2013). Eine Anwendung in klinischen Schlaganfallstudien ist somit für die Zukunft denkbar und vielversprechend.

1.5 Stärken und Limitationen der Arbeit

Das Studiendesign dieser Arbeit erfüllt den Anspruch eines größeren Zeitfensters zwischen Ischämieinduktion und Therapie. Die Versuchstiere wurden erst 24 Stunden nach Ischämie mit Ghrelin therapiert und nicht vor bzw. unmittelbar nach Ischämie, also einem Zeitfenster das klinisch umsetzbar ist. Nach der siebentägigen Therapie mit Ghrelin wurden die Tiere für weitere 21 Tage beobachtet. Es wurde das Gewicht dokumentiert und es wurden Verhaltenstests durchgeführt. Auf diese Weise konnten die therapeutischen Effekte von Ghrelin auf neurologische Funktionen umfassend beurteilt werden. Die durch Ischämie verursachten Ausfälle der sensomotorischen Funktion besserten sich in der Therapiegruppe nachhaltiger. Die Studie wurde dabei an einer aussagekräftigen Anzahl von Tieren durchgeführt.

In den histologischen Auswertungen wurde eine gesteigerte Neurogeneserate festgestellt. Von besonderer Bedeutung hierbei ist, dass die neu entstandenen Zellen 28 Tage nach Ischämieinduktion noch nachweisbar waren. Somit kann von einer tatsächlichen Regeneration ausgegangen werden. Nach zerebraler Ischämie kommt es im Gehirn zu gesteigerter Neurogenese bzw. zu

Einwanderung von Neuroblasten (Kernie et al, 2010). Wenige dieser Zellen, von denen ein Großteil abstirbt, entwickelt sich zu adulten Neuronen (Arvidsson et al, 2002, Kernie et al, 2010). Durch die Therapie mit Ghrelin kommt es dazu, dass sich neuentstandene Zellen zu einem höheren Anteil zu Neuronen differenzieren. Zusätzlich dazu wird durch Ghrelin das Überleben der neuentstandenen Zellen unterstützt.

Dass keine neuroprotektive Wirkung durch Reduktion der Infarkt volumina in der Therapiegruppe nachgewiesen werden konnte, ist auf das Studiendesign zurückzuführen. Es ist aufgrund der langen Zeitspanne zwischen Ischämie und Therapie davon auszugehen, dass die Effekte in der Therapiegruppe durch neuroregenerative Wirkungen von Ghrelin erzeugt wurden.

Voraussetzung für die Anwendung in klinischen Schlaganfallstudien ist die Kenntnis von der wirksamen Dosis sowie der Festlegung eines genauen Zeitfensters, in dem eine Therapie mit Ghrelin erfolgen soll. In der vorliegenden Arbeit wurden weder das Zeitfenster für die Therapie noch die Dosierung von Ghrelin ermittelt. Es müssen somit Zeitfensterfindungsstudien sowie Dosisfindungsstudien erfolgen bevor eine klinische Studie durchgeführt wird.

1.6 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend kann beschrieben werden, dass Ghrelin ein vielversprechender Wirkstoff für zukünftige Therapien von Schlaganfallpatienten ist. Eine funktionelle und strukturelle Erholung konnte noch bei Therapiebeginn, 24 Stunden nach Ischämie, und somit lange nachdem eine Lysetherapie möglich ist, nachgewiesen werden. Diese neuen Erkenntnisse lassen darauf hoffen, dass zukünftig eine Therapie des Schlaganfalls auch dann noch möglich sein wird, wenn die Patienten medizinische Hilfe erst Stunden nach dem Einsetzen der Symptome in Anspruch nehmen. Vor klinischen Studien zu Ghrelin als Schlaganfalltherapie sollten das therapeutische Zeitfenster und die optimale Dosis ermittelt werden. Zudem sollten weitere regenerative Mechanismen, wie zum Beispiel die Dendritogenese und die Angiogenese untersucht werden.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriposphat
Bcl2	B-Cell lymphoma 2
BGaR	Biotin Goat anti Rat Antikörper
BgaRb	Biotin Goat ani Rabbit Antikörper
BR	Blocking Reagenz
BrdU	Bromodesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
DCX	Doublecortin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
g	Gramm
GOAT	Ghrelin-O-Acyltransferase
h	Stunden
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
Il-6	Interleukin 6
l	Liter
li	links
MCAO	middle cerebral artery occlusion
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mrd.	Milliarden
NaCl	Natriumchlorid
NeuN	Neuronal Nuclear Protein

nNOS	neuronaler Nitric Oxide Synthase
NVUs	neuro vaskular units
Par-4	Prostate apoptosis response-4
PBS	Phosphate-gepufferte Saline
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
re	rechts
rtPA	recombinant tissue plasminogen activator
SSC	Saline Sodium Citrate Puffer
TCS	Tissue cryoprotectant solution
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

LITERATURVERZEICHNIS

Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. (1993)
Classification of Subtype of Acute Ischemic Stroke. Definition for Use in a Multicenter Clinical Trial (TOAST).
Stroke 24: 35-41

Agut J, Front E, Sacritan A, Ortiz JA. (1983)
Radioactivity incorporation into different cerebral phospholipids after oral administration of ¹⁴C methyl CDP-choline.
Arztneimittelforschung 33: 1048-1050

Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Saqqur M, Demchuk AM, Moya LA, Hill MD, Wojner AW. (2004)
Ultrasound-Enhanced Systemic Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke.
N Engl J Med 351: 2170-2178

Allen CL, Bayraktutan U. (2008)
Risk Factors for Ischemic Stroke.
Int J Stroke 3: 105-116

Allen E (1912)
The Cessation of Mitosis in the Central Nervous System of the Albino Rat.
J Comp Neurol 22: 547-568

Altmann J (1965)
Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal neurogenesis in Rats.
J Comp Neurol 124: 319-335

Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Fiedman JM, Tschöp MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, Diano S. (2008)
UBP2 Mediates Ghrelin's Action on NPY/AgRP Neurons by Lowering Free Radicals.
Nature 454: 846-851

Andrews ZB, Erion DM, Beiler R, Choi CS, Shulman GI, Horvath TL. (2010)
Uncoupling Protein-2 Decreases the Lipogenic Actions of Ghrelin.
Endocrinology 151: 2078-2086

Andrews ZB (2011)
The Extra-Hypothalamic Actions of Ghrelin on Neuronal Function.
Trends in Neurosciences 34: 31-40

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. (1995)

Glutamate-Induced Neuronal Death: A Succession of Necrosis or Apoptosis Depending on Mitochondrial Ischemia.

Neuron 15: 961-973

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. (2002)

Neuronal Replacement from Endogenous Precursors in the Adult Brain After Stroke.

Nat Med 8: 963-970

Benavides A, Pastor D, Santos P, Tranque P, Calvo S.(2005)

CHOP Plays a Pivotal Role in the Astrocyte Death Induced by Oxygen and Glucose Deprivation.

Glia 52: 261-275

Berlit P, Basiswissen Neurologie, 6.Auflage, Springer Verlag.

Bouet V, Freret T, Toutain J, Divoux D, Boulouard M, Schumann-Bard P (2007)
Sensomotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse.

Experimental neurology 203: 555-567

Broughton BR, reutens DC, Sobey CG. (2009)

Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia.

Stroke 40: 331-339

Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. (2003)

Transient Expression of Doublecortin During Adult Neurogenesis.

J Comp Neurol 467: 1-10

Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH. (2010)

Ghrelin in the Regulation of Body Weight and Metabolism.

Front Neuroendocrinol 31: 44-60

Chen ST, Hsu CY, Hogan EL.(1986)

A Model of Focal Ischemic Stroke in the Rat: Reproducible Extensive Cortical Infarction.

Stroke 17: 738-743

Cheyuo C, Wu R, Zohu M, Jacob A, Coppa G, Wang P. (2011)

Ghrelin Suppresses Inflammation and Neuronal Nitric Oxide Synthase in Focal Cerebral Ischemia via the vagus nerve.

Shock 35: 258-265

Chung H, Kim E, Lee DH, Seo S, Ju S, Lee D, Kim H, Park S.(2007)

Ghrelin Inhibits Apoptosis in Hypothalamic Neuronal Cells During Oxygen-Glucose Deprivation.

Endocrinol 148: 148-159

Chung H, Seo S, Mood M, Park S. (2008)

Phosphatidylinositol-3-Kinase/ Akt/ Glycogen Synthase Kinase-3 Beta and ERK 1/2 Pathways Mediate Protective Effects of Acylated and Unacylated Ghrelin against Oxygen-Glucose Deprivation- Induced Apoptosis in Primary Rat Cortical Neuronal Cells.

J Endocrinol 198: 511-521

Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2000)

Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans.

Endocrinol 141: 4255-4261

Deetjen P, Speckmann E-J, Hescheler J (2005) Physiologie

4. Auflage, Elsevier Urban und Fischer Verl., München

Denes A, Thornton P, Rothwell NJ, Allan SM.(2010)

Inflammation and Brain Injury: Acute Cerebral Ischemia, Peripheral and Central Inflammation.

Brain Behav Immun 24: 708-723

Deutsche Gesellschaft für Neurologie / Deutsche Schlaganfallgesellschaft (2008)

Primär-und Sekundärprävention der zerebralen Ischämie

Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horwath B, Gaskin FS, Nokata N, Jaeger LB, Banks WA, Morley JE, Pinto S, Sherwin RS, Xu L, Yamada KA, Sleeman MW, Tschöp MH, Horvath TL. (2006)

Ghrelin Controls Hippocampal Spine Synapse Density and Memory Performance.

Nat Neurosci 9: 381-388

Diener H-C (2008) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie,

4.Auflage, Georg Thieme Verl., Stuttgart

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. (1998)

Neurogenesis in the Adult Human Hippocampus.

Natur Medicine 4: 1313-1317

European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO (2008)

Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack.

Cerebrovasc Dis 25:457–507.

- Feeney CJ (2009)
Astrocyte: Response to injury. Encyclopedia of Neuroscience, 1. Auflage,
Elsevier Urban und Fischer Verl., München
- Feigin VL (2005)
Stroke Epidemiology in the Developing World.
Lancet 365: 2160-2161
- Ferro JM (2003)
Cardioembolic stroke: an update.
Lancet Neurology 2: 177-88
- Fisher CM (1982)
Lacunar strokes and infarcts: a review.
Neurology 32: 871-876
- Gage FH (2000)
Mammalian Neural Stem Cells.
Science 287: 1433-1438
- Galea LA (2008)
Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents.
Brain Res Rev 57(2): 332-41
- Gerhard A, Neumaier B, Elitok E, Glatting G, Ries V, Tomczak R, Ludolph AC, Reske SN. (2000)
In Vivo Imaging of Activated Microglia Using [¹¹C] PK 11195 and Positron Emission Tomography in Patients After Ischemic Stroke.
Neuroreport 11: 2957-2960
- Giles MF, Rothwell PM. (2009)
Transient Ischemic attack: Clinical Relevance, Risk Prediction and Urgency of Secondary Prevention.
Curr Opin Neurol 22(1): 46-53
- Ginsberg MD, Busto R. (1989)
Rodent Models of Cerebral Ischemia.
Stroke 20:1627-1642
- Ginsberg MD (2008)
Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future.
Neuropharmacology 55: 363-389
- Gleixner C, Müller M, Wirth SB, Neurologie und Psychiatrie, 6. Auflage,
Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach.

- Gorelick PB (2000)
Neuroprotektion in Acute Ischemic Stroke: a Tale of for Whom the Bell Tolls?
Lancet 355: 1925-1926
- Gould E, Tanapat P. (1997)
Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat.
Neuroscience 80(2): 427-36
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. (1998)
Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress.
Proc Natl Acad Sci USA 95(6): 3168-71
- Graham DI (1997) Greenfield's Neuropathology, 2. Auflage, Arnold, London
- Hacke W, Ringel P, Stingle R. (1999)
Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke: Controlled Trials and Clinical Experience.
Neurology 53: 3-14
- Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, Brodt T, Frankel M, Grotta JC, Haley EC Jr, Kwiatkowski T, Lwvone SR, Lewansowski C, Lu M, Lyden P, Marler JR, Patel S, Tilley BC, Albers G, Bluhmki E, Wilhelm M, Hamilton S. (2004)
Association of Outcome with Early Stroke Treatment: Pooled Analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-pa Stroke Trials.
Lancet 363: 768-774
- Hankey GJ et al. (2006)
Neuroprotection for Acute Ischemic Stroke: Hope Reignited.
Lancet Neurol 5: 287-288
- Hankey GJ (2006)
Potential New Risk Factors For Ischemic Stroke: What is Their Potential?
Stroke 37: 2181-2188
- Hennes, HJ (1999) Anästhesiologische Aspekte der gestörten zerebralen Perfusion, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart
- Heuschmann, Kolominsky-Rabas PL, Roether J, Misselwitz B, Lowitzsch K, Heidrich J, Hermanek P, Leffmann C, Sitzer M, Biegler M, Buecker-Nott, Berger K. (2004)
Predictors of in-hospital mortality in patients with acute ischemic stroke treated with thrombolytic therapy.
JAMA 292/15: 1831-8
- Heuschmann, PU, (2010)
Frequency and Care of Stroke in Germany,

Akt Neurol 37: 333-340

Hurn PD, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Kaler LJ, Vandembark AA, Offner H. (2007)

T- and B-Cell-Deficient Mice with Experimental Stroke Have Reduced Lesion Size and Inflammation.

J Cereb Blood Flow Metab 27: 1798-1805

Hwang S, Moon M, Kim S, Hwang L, Ahn KJ, Park S. (2009)

Neuroprotective Effect of Ghrelin is Associated With Decreased Expression of Prostate Apoptosis Response-4.

Endocr J 56: 609-617

Jablonska A, Kozłowska H, Markiewicz I, Domanska-Janik K, Ludomska B. (2010)

Transplantation of Neuronal Stem Cells Derived from Human Cord Blood to the Brain of Adult and Neonatal Rats.

Acta Neurobiol Exp 70: 337-350

Jablonska A, Lukomska B. (2011)

Stroke Induced Brain Changes: Implications for Stem Cell Transplantation.

Acta Neurobiol Exp 71: 74-85

Janowski M, Gornicka-Pawlak E, Kozłowska H, Domanska-Janik K, Gielecki J, Lukomska B. (2008)

Structural and Functional Characteristics of a Model for Deep-Seated Lacunar Infarct in Rats.

J Neurol Sci 273: 40-48

Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA. (2001)
Neurogenesis in Dentate Subgranular Zone and Rostal Subventricular Zone After Focal Cerebral Ischemia in the Rat.

Proc Natl Acad Sci 98: 4710-4715

Jin K et al. (2003)

Direct Migration of Neuronal Precursors into the Ischemic Cerebral Cortex and Striatum.

Mol Cell Neurosci 24: 171-189

Jin K, Wang X, Xie L, Mao CO, Greenberg DA (2010)

Transgenic ablation of doublecortin-expressing cells suppresses adult neurogenesis and worsens stroke outcome in mice.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 7993-8

Johansson I, Destefanis S, Aberg ND, Aberg MA, Blomgren K, Zhu C, Gehe C, Granata R, Ghigo E, Muccioli G, Eriksson PS, Isgaard J. (2008)

Proliferative and Protective Effects of Growth Hormone Secretagogues on Adult Rat Hippocampal Progenitor Cells.

Endocrinology 149: 2191-2199

Johnston, SC, Mendis S, Mathers CD. (2009)
Global variation in Stroke Burden and Mortality: Estimates from Monitoring, Surveillance, and Modelling. *Lancet Neurol.*; 8: 345-354

Karl C, Couillard-Despres S, Prang P, Munding M, Kilb W, Brigadski T, Plätz S, Mages W, Luhmann H, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L. (2005)
Neuronal Precursor-Specific Activity of a Human Doule cortin Regulatory Sequence.
J Neurochemistry 92: 264-282

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1997)
More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment.
Nature 1997 386(6624): 493-5

Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. (2003)
Development and Disease. Early Determination and Long-Term Persistence of Adult-Generated New Neurons in the Hippocampus of Mice.
Development 130: 391-399

Kernie SG, Parent JM. (2010)
Forebrain Neurogenesis After Focal Ischemic and Traumatic Brain Injury.
Neurobiol of Dis 37: 267-274

Köhrmann M, Jüttler E, Huttner HB, Schellinger PD. (2007)
Thrombolysis for Ischemic Stroke: an Update.
Nervenarzt 78: 393-405

Koizumi J, Nakazawa T, Yoshida Y. (1985)
Reperusable Brain Infarction Model in Rat. Proceedings of the 10th Meeting of the Japanese Stroke Society Kyoto.
Japan: Japanese Stroke Society: 159

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. (1999)
Ghrelin is a Growth-hormone-Releasing Acylated Peptide from Stomach.
Nature 402: 656-660
Kojima M et al. (2005)
Ghrelin, structure und function.
Physiological Reviews 85: 495-522

Kolominsky-Rabas; PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundörfer B, Schöffski O, Krobot KJ. (2006)
Lifetime Cost of Ischemic Stroke in Germany: Results and National Projection from a Population based Stroke Registry.
Stroke; 37: 1557-1563

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. (1996)

Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation.

J Neurosci 16(6): 2027-33

Külkens S, Hacke W. (2007)

Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: review of SITS-MOST and other Phase IV studies.

Expert Rev Neurother 7:783-8

Van der Lely AJ et al (2004)

Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin.

Endocrine Reviews 25 426-457

Madeddu P (2005)

Therapeutic Angiogenesis and Vasculogenesis für Tissue Regeneration.

Exp Physiol 90: 315-326

Markiewicz I, Lukomska B. (2006)

The Role of the Central Nervous System.

Acta Neurobiol Exp 66: 343-358

Markus HS (2004)

Cerebral perfusion and stroke.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 75(3): 353-361

Marler JR (1995)

For the NINDS- Study Group. Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke.

N Engl J Med 333: 1581-1587

Mattle HP, Arnold M, Georgiadis D, Baumann C, Nedeltchev K, Benninger D, Remonda L, von Büdingen C, Diana A, Pangalu A, Schroth G, Baumgartner RW. (2008)

Comparison of Intraarterial and Intravenous Thrombolysis for Ischemic Stroke With Hyperdense Middle Cerebral Artery Sign.

Stroke 39: 379-383

Mio Y, Xia Q, Hou Z, Zheng Y, Pan H, Zhu S. (2007)

Ghrelin Protects Cortical Neuron Against Focal Ischemia / Reperfusion in Rats.

Biochem Biophys Res Commun 359: 795-800

Minnerup J, Wersching H, Ringelstein EB, Schilling M, Schäbitz WR, Wellmann J, Berger K (2011)

Impact of the extended thrombolysis time window on the proportion of recombinant tissue-type plasminogen activator-treated stroke patients and on door-to-needle time.

Stroke 42: 2838-43

- Minnerup J, Schmidt A, Albert-Weissenberger C, Kleinschnitz C (2013)
Stroke: Pathophysiology and Therapy.
Morgan & Claypool Life Sciences
- Moon M, Kim S, Hwang L, Park S. (2009)
Ghrelin Regulates Hippocampal Neurogenesis in Adult Mice.
Endocr J 56: 525-531
- Moonis M (2009)
Intraarterial Thrombolysis Within the First Three Hours After Acute Ischemic Stroke in Selected Patients.
Stroke 40: 2611-2612
- Mumenthaler M (2008) Neurologie, 12. Auflage, Georg Thieme Verl. Stuttgart
- Nagel S, Schellinger PD, Hartmann M, Juettler E, Huttner HB, Ringel P, Schwab S, Köhrmann M (2009)
Therapy of Acute Basilar Artery Occlusion: Intraarterial Thrombolysis Alone Versus Bridging Therapy.
Stroke 40: 140-146
- Naranda T, Kaufman RI, Li J, Wong K, Boge A, Hallen D, Fung KY, Duncan MW, Andersen N, Goldstein A, Olsson L. (2007)
Activation of Erythropoietin Receptor Through a Novel Extracellular Binding Site.
Endocrinology 143: 2293-2302
- Nogueiras R, Lopez M, Dieguez C (2010)
Regulation of Lipid Metabolism by Energy Availability: A Role For the Central Nervous System.
Obesity Reviews 11:185-201
- O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW (2006)
1,026 experimental treatments in acute stroke.
Annals of Neurology 59: 467-477
- Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST (2006)
A Neurovascular Niche for Neurogenesis After Stroke.
J Neurosci 26: 13007-13016
- Ortega FJ, Jolkkonen J, Mahy N, Rodriguez MJ (2013)
Glibenclamide enhances neurogenesis and improves long-term functional recovery after transient focal cerebral ischemia.
J Cereb Blood Flow Metab. 33(3): 356-64
- Osmann AM, Porritt MJ, Nilsson M, Kuhn HG (2011)

Long-term stimulation of neuronal progenitor cell migration after cortical ischemia in mice.

Stroke 42(12): 3559-65

Peino R, Baldelli R, Rodriguez-Garcia J, Rodriguez-Segade S, Kojima M, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF (2000)
Ghrelin induced growth hormone in humans.

European Journal of Endocrinology 143 R11-R14

Ramón y Cajal S (1928)

Degeneration and Regeneration of the Nervous System

Oxford Uni Press, London

Sacchetti ML (2008)

Is it Time to Definitely Abandon Neuroprotection in Acute Ischemic Stroke?

Stroke 39:1659-1660

Saka O, McGuire A, Wolfe C (2009)

Cost of Stroke in the United Kingdom.

Age Ageing, 38: 27-32

Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R (2003)

Microglial Activation Precedes and Predominates Over Macrophage Infiltration in Transient Focal Cerebral Ischemia: A Study in Green Fluorescent Protein Transgenic Bone Marrow Chimeric Mice.

Exp Neurol 183: 25-33

Schneider M (2009)

Lebens- und Versorgungssituation von Schlaganfallpatienten. 3-Monats-Follow-up des Qualitätssicherungsprojektes Nordwestdeutschland.

Nervenheilkunde 3: 114-118

Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U SAINT II Trial Investigators (2007)

NXY-059 For the Treatment of Acute Ischemic Stroke.

N Engl J Med 357: 562-571

Siesjö, BK (1992)

Pathophysiology and Treatment of Focal Cerebral Ischemia.

Neurosurg 77: 169-184

Smith WS, Sung G, Saver J, Budzik R, Duckwiler G, Liebeskind DS, Lutsep HL, Rymer MM, Higashida RT, Starkman S, Gobin YP, Multi MERCI Investigators, Frei D, Grobelny T, Hellinger F, Huddle D, Kidwell C, Koroshetz W, Markus M, Nesbit G, Silverman IE (2008)

Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke: Final Results of the Multi MERCI Trial.

Stroke 39: 1205-1212

Stevens SL, Bao J, Hollis J, Lessov NS, Clark WM, Stenzel-Poore MP (2002)
The Use of Flow Cytometry to Evaluate Temporal Changes in Inflammatory
Cells Following Focal Cerebral Ischemia in Mice.

Brain Res 932: 110-119

Takiguchi S, Takata A, Murakami K, Miyazaki Y, Yanagimoto Y, Kurokawa Y,
Mori M, Doki Y, (2013)

Clinical application of ghrelin administration for gastric cancer patients
undergoing gastrectomy.

Gastric Cancer 14: 167-73

Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981)

Focal Cerebral Ischemia in the Rat: 1 Description of Technique and Early
Neuropathological Consequences Following Middle Cerebral Artery Occlusion.

J Cereb Blood Flow Metab 1: 53-60

Taupin P (2006)

The Therapeutic Potential of Adult Neuronal Stem Cells.

Curr Opin Mol Ther 8: 225-231

Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT,
Kokaia Z, Lindvall O (2006)

Persistent Production of Neurons from Brain Stem Cells During Recovery After
Stroke.

Stem Cells 24: 739-747

Thornton P, Pinteaux E, Allan SM, Rothwell NJ (2008)

Matrix Metalloproteinase-9 and Urokinase Plasminogen Activator Mediate
Interleukin-1-Induced Neurotoxicity.

Mol Cell Neurosci 37: 135-142

Tian L, Rauvala H, Gahmgerb CG (2009)

Neuronal Regulation of Immune Responses in the Central Nervous System.

Tends Immunol 30: 91-99

Torres-Aleman (2010)

Towards Comprehensive Neurobiology of IGF-I.

Dev Neurobiol 70: 384-396

Tschöp M, Lahner H, Feldmaier H, Grasberger H, Morrison KM, Janssen OE,
Attanaio AF, Strasburger CJ (2000)

Ghrelin Induces Adiposity in Rodents.

Nature 407: 908-913

Tsubone T, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H (2005)

Ghrelin Regulates Adiposity in white Adipose Tissue and UCP1 mRNA Expression in Brown Adipose Tissue in Mice.
Regulatory Peptides 130: 97-103

Vandeputte C, Thomas D, Dresselaers T, Crabbe A, Verfaillie C, Baekelandt V, Van Laere K, Himmelreich U (2011)
Characterization of the Inflammatory Response in a Photothrombotic Stroke Model by MRI: Implications for Stem Cell Transplantation.
Mol Imagin Biol doi:10.1007/s11307-010-0395-9

Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999)
Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice.
Proc Natl Acad Sci USA 96(23): 13427-31

Wang L, zhang Z, Wang Y, Zhang R, Choop M (2004)
Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats.
Stroke 35: 1732-1737

Watson BD, Dietrich WD Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD (1985)
Induction of Reproducible Brain Infarction by Photochemically Initiated Thrombosis.
Ann Neurol 17: 497-504

Wojchowski DM, Greogory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ (1999)
Signal Transduction in the Erythropoietin Receptor System.
Exp Cell Res 253: 143-156

Wortley KE, del Rincon JP, Murray DJ, Garcia K, Iida K, Thorner MO, Sleeman MW (2005)
Absence of Ghrelin Protects Against Early-Onset Obesity.
Journal of Clinical Investigation 115: 3573-3578

Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR (2001)
Ghrelin Causes Hyperphagia and Obesity in Rats.
Diabetes 50:2540-2547

Xiong Y, Mahmood A, Chopp M v(2010)
Angiogenesis, Neurogenesis and Brain Recovery of Function Following Injury.
Curr Opin Invesig Drugs 11. 298-308

Yamashita S, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, Carcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakagucki M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K (2006)
Subventricular Zone-Derived Neuroblasts Migrate and Differentiate into mature Neurons in the Post-Stroke Adult Striatum.
J Neurosci 26: 6627-6636

- Zacharek A, Chen J, Cui X, Yang Y, Chopp M (2009)
Simvastatin increases notch signaling activity and promotes arteriogenesis after stroke.
Stroke 40: 254-260
- Zhang W, Lin TR, Hu Y, Fan Y, Zhao L, Stuenkel EL, Mulholland MW (2004)
Ghrelin Stimulates Neurogenesis in the Dorsal Motor Nucleus of the Vagus.
J Physiol 559: 729-737
- Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M (2002)
Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells Participate in Cerebral Neovascularization After Focal Cerebral Ischemia in the Adult Mouse.
Circ Res 90: 284-288
- Zhao Y et al. (2010)
Targeting Astrocytes for Stroke Therapy.
Neurotherapeutic 7: 439-451
- Zhao L, Du W, X Zhao, Liu L, Wang Y, Wang A, G Liu, Wang Y, Xu Y (2013)
Günstige funktionelle Erholung in Übergewicht ischämischen Schlaganfall Hinterbliebene: Erkenntnisse aus der China National Stroke Registry.
J Stroke Cerebrovasx Dis 13: 1052-3057



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn

Dr. rer. nat. Kai Diederich
Klinik und Poliklinik für Neurologie
Westfälische Wilhelms-Universität
Albert-Schweitzer-Str. 33
48129 Münster

Tierversuchsvorhaben;

Genehmigung gem. § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz in der Bekanntmachung der Neufassung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206) in der z.Zt. gültigen Fassung

Ihr Antrag vom 17.12.2009; Ihre E-Mail vom 05.05.2010

Sehr geehrter Herr Dr. Diederich,

auf Grund des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) erteile ich Ihnen unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Tierversuches

„Tierexperimentelle Untersuchungen zur strukturellen und funktionellen Regeneration nach zerebraler Ischämie durch das Peptidhormon Ghrelin“.

Ihrem Genehmigungsantrag entsprechend obliegt die Verantwortung für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens folgenden Personen:

Verantwortlicher Leiter: Dr. rer. nat. Kai Diederich

Stellvertretender Leiter: Dr. rer. nat. Sevgi Sevimli

Diese Genehmigung ist für die Dauer von 36 Monaten ab dem 10.05.2010 befristet bis zum

31.05.2013.

Auskunft erteilt:

Herr Salert

Direktwahl 02361-305-3709

Fax 02361/305-3439

FB87-Tschutz@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen

87-51.04.2010.A081

bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:

Ihr Aktenzeichen:

Datum: 10.05.2010

Hauptsitz:

Leibnizstraße 10

45659 Recklinghausen

Telefon 02361 305-0

Fax 02361 305-3215

poststelle@lanuv.nrw.de

www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:

Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:

Ab Recklinghausen Hbf mit

Buslinie 236 bis Haltestelle

"Siemensstraße" oder mit

Buslinie 235 bis Haltestelle

"Blitzkuhlenstraße" und 10 Min.

Fußweg in Richtung Trabrenn-

bahn bis Siemensstraße

Bankverbindung:

Landeskasse Düsseldorf

Konto-Nr.: 41 000 12

West LB AG

(BLZ 300 500 00)

BIC-Code: WELADED

IBAN-Code: DE 41 3005

0000 0004 1000 12