

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Neurologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. E. B. Ringelstein -

**Effekte des Granulocyte-Colony-Stimulating Factors
(G-CSF) nach Schlaganfall bei alten Ratten**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Kai Stöcker aus Münster

2011

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

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W.-R. Schäbitz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Simone König

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Neurologie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. E. B. Ringelstein -
Referent: Prof. Dr. med. W.R. Schäbitz
Koreferent: Prof. Dr. rer. Nat. Simone König

Zusammenfassung

*Effekte des Granulocyte-Colony-Stimulating Factors (G-CSF)
nach Schlaganfall bei alten Ratten*

Kai Stöcker

Der hämatopoetische Wachstumsfaktor G-CSF wurde schon in vorherigen Studien als wirksame Option der Schlaganfalltherapie vorgestellt. In Tierversuchen verringerte er die Infarktgröße, erhöhte die Anzahl neu gebildeter Neurone und verbesserte das funktionelle Gesamtergebnis.

Diese Studien wurden jedoch ausschließlich bei jungen Tieren durchgeführt. Da Schlaganfälle hauptsächlich alte Menschen treffen, untersuchten wir in unserer Studie die Effekte von G-CSF nach Schlaganfällen bei alten Ratten.

Das funktionelle Gesamtergebnis wurde anhand von Verhaltenstests wie dem Schrägflächentest, dem Drehbalkentest und dem Radialarmlabyrinth festgehalten. Mithilfe einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung mit NeuN und BrdU wurden Subventrikuläre Zone, Gyrus Dentatus und Periinfarktareal auf neu gebildete Zellen untersucht und zudem die Infarktgröße bestimmt.

G-CSF hatte in unserer Studie bei alten Ratten in den Tests einen durchgehend positiven Effekt auf die motorische Funktion (Drehbalkentest, Schrägflächentest) und das Arbeitsgedächtnis (Radialarmlabyrinth). Diese nutzbringenden Effekte waren mit Ausnahme des Drehbalkentests temporär auf die Behandlungsphase begrenzt. Die Infarktgröße war nicht signifikant verändert. Auf zellulärer Ebene fanden wir allgemein einen signifikanten Anstieg neugeborener Zellen in der Subventrikulären Zone (SVZ) und dem Gyrus Dentatus als auch einen Anstieg neugeborener Neurone in der SVZ der Infarkthemisphäre. Auffallend war zudem eine signifikante Senkung der Mortalität.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass G-CSF bei Schlaganfällen alter Ratten einen nutzbringenden Effekt auf das Gesamtergebnis hat, welcher wahrscheinlich durch unterstützende zelluläre Prozesse wie Neurogenese zu erklären ist.

Die Arbeit wurde am 25.11. vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-052/08).

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2011

ERKLÄRUNG

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

Effekte des Granulocyte-Colony-Stimulating Factors (G-CSF) nach Schlaganfall bei alten Ratten

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitäts- klinikums Münster

unter der Anleitung von:

Prof. Dr. med. W.-R. Schäbitz

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten 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.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	GRUNDLAGEN	3
2.1	Der Schlaganfall.....	3
2.2	Risikofaktoren für einen Schlaganfall.....	4
2.3	Symptome eines Schlaganfalls	5
2.4	Pathophysiologie des Schlaganfalls	6
2.5	Aktuelle Schlaganfalltherapie.....	8
2.6	Geschichte der Neurogeneseforschung	10
2.7	BrdU (5-Bromo-2-Desoxyuridin).....	10
2.8	Grundbegriff „Adulte Neurogenese“	12
2.9	Der Granulocyte-Colony-Stimulating Factor (G-CSF)	13
3	MATERIAL & METHODEN.....	15
3.1	Tiere	15
3.2	Operation (Permanent Transcranial Middle Cerebral Artery Occlusion).....	15
3.3	G-CSF-Behandlung und BrdU-Markierung	17
3.4	Verhaltenstests	17
3.4.1	Drehbalkentest (Rotating Pole).....	18
3.4.2	Schrägflächentest (Inclined Plane).....	19
3.4.3	Radialarmabyrinth (Radial-Arm Maze)	20
3.5	Anfertigen der Gewebsschnitte.....	21
3.6	Erfassung des Infarktvolumens	21
3.7	Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung	22
3.7.1	Verwendete Antikörper	23
3.7.2	Weitere Färbematerialien	23
3.8	Auszählungsprozeduren	24
3.9	Statistische Analyse.....	26
4	ERGEBNISSE	27
4.1	Generelle Beobachtungen.....	27
4.1.1	Gewichtsverlauf	27
4.1.2	Mortalitätsrate	27
4.2	Verhaltenstests	28

4.2.1	Drehbalkentest (Rotating Pole).....	28
4.2.2	Schrägflächentest (Inclined Plane).....	29
4.2.3	Radialarmlabirynthtest (Radial-Arm Maze).....	30
4.3	Immunohistochemische Analysen	31
4.3.1	Infarktgröße.....	31
4.3.2	Periinfarktzone.....	31
4.3.3	Subventrikuläre Zone (SVZ).....	32
4.3.4	Gyrus Dentatus.....	32
4.3.5	BrdU-NeuN-Doppelpositivität.....	34
5	DISKUSSION	36
5.1	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse.....	36
5.2	Diskussion der Methodik.....	37
5.2.1	Permanente Transkranielle Okklusion der A. cerebri media (Permanent Transcranial Middle Cerebral Artery Occlusion; pMCAO).....	37
5.2.2	G-CSF-Behandlung.....	38
5.2.3	Infarktgrößenauswertung	39
5.2.4	Verhaltenstests	39
5.2.5	BrdU- und NeuN-Auswertung	39
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	40
5.3.1	Funktionelles Outcome	41
5.3.2	Mortalität.....	42
5.3.3	Infarktgröße.....	42
5.3.4	Bedeutung des Faktors „Alter“	43
5.4	Diskussion der zu Grunde liegenden Mechanismen	43
6	ZUSAMMENFASSUNG UND TRANSFER IN KLINISCHE STUDIEN	48
7	ABKÜRZUNGEN	49
8	LITERATURVERZEICHNIS	51
9	LEBENS LAUF	62
10	DANKSAGUNG	63

1 Einleitung

In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass der hämatopoetische Wachstumsfaktor G-CSF (Granulocyte-Colony-Stimulating Factor, übersetzt „Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor“) nach diversen experimentellen Schlaganfalltypen die Infarktgröße verringert und das funktionelle Endergebnis verbessert (Shyu et al. 2004, Lee et al. 2005, Xiao et al. 2007, Han et al. 2008). Unter ischämischen Bedingungen verhindert G-CSF den programmierten neuronalen Zelltod (Komine-Kobayashi et al. 2006) und stimuliert die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen. Nach aktuellem Stand der Wissenschaft sind diese und andere Mechanismen, einschließlich der Immunmodulation und der Blutgefäßplastizität, für die Verringerung der Infarktgröße und die Verbesserung des funktionellen Endergebnisses nach experimentellen Schlaganfällen bei adulten Nagetieren verantwortlich (Minnerup et al. 2008, Piao et al. 2009).

Die umfassende präklinische Beweislage der Effektivität von G-CSF in Schlaganfallstudien wird anhand der engen Ausrichtung nach den STAIR-Empfehlungen (STAIR 1999) deutlich. Diese stellen vom Stroke Therapy Academic Industry Roundtable 1999 erstellte Vorschläge zur besseren Übertragung von präklinischen auf klinische Studien dar. Zusammengefasste allgemeine Anforderungen sind:

1. Erstellung passender Dosis-Wirkungs-Kurven
2. Definierung des genauen Zeitfensters für die Behandlung
3. Zuerst Durchführung permanenter, später transienter Ischämie Modelle
4. Zuerst Studien an Ratten, später an Katzen und Primaten, schlussendlich größere klinische Studien
5. Ständige Kontrolle und Auswertung der physiologischen Parameter
6. Erfassung von Kurz- und Langzeitergebnisse, sowohl histologisch als auch funktionell

G-CSF wird momentan als eines der präklinisch am Besten untersuchten Schlaganfallmittel angesehen, die in den letzten Jahren in die klinische Erprobung übertragen wurden (Philip et al. 2009). Eine mögliche Schwäche des präklinischen Datenmaterials liegt jedoch in den fehlenden Nachweisen bei alten Tieren, obwohl Schlaganfälle überwiegend im Alter auftreten (Barnett 2002, D'Agostino et al. 1994). Es ist ein generelles Problem in der Schlaganfallforschung, dass aufgrund von Kosteneffektivität und Praktikabilität die meisten

Einleitung

Studien an jungen Tieren durchgeführt werden. Der mangelnde Erfolg vieler neuroprotektiver Substanzen in klinischen Studien trotz vorheriger Erfolge in tierexperimentellen Untersuchungen könnte zumindest teilweise durch fehlende Ergebnisse präklinischer Arbeiten bei alten Individuen erklärt werden (Wang et al. 1995). Das alte Gehirn zeigt im Vergleich zum jungen Gehirn eine erhöhte Anfälligkeit für zerebrale Ischämien und bietet nur eine begrenzte Erholungskapazität von diesen ischämischen Schäden (Popa-Wagner et al. 1998, Badan et al. 2003, Rosen et al. 2005, Buchhold et al. 2007, Popa-Wagner et al. 2007). Vor diesem Hintergrund haben wir somit die Therapieeffekte von G-CSF auf Mortalität, neurologische Funktion, Infarkt volumen und Neurogenese bei alten Tieren untersucht.

2 Grundlagen

2.1 Der Schlaganfall

Ein Schlaganfall, auch akuter zerebraler Insult, Hirninsult oder Apoplex genannt, stellt ein akutes fokales neurologisches Defizit aufgrund einer umschriebenen Durchblutungsstörung des Gehirns dar. Sofern die Symptome weniger als 24 Stunden bestehen, spricht man von einer transitorischen ischämischen Attacke (TIA). Das Risiko nach einer TIA in der nahen Folgezeit einen vollendeten Schlaganfall zu erleben ist hierbei deutlich erhöht.

Epidemiologisch kommt dem Schlaganfall mit einer Inzidenz von 182/100 000 Einwohner und einer Gesamtzahl der Schlaganfälle einschließlich Rezidive von etwa 170 000 bis 250 000 (Kolominsky-Rabas und Heuschmann 2002) pro Jahr in Deutschland eine immense Bedeutung zu. Etwa 80 000 mit Schlaganfällen assoziierte Todesfälle 2003 und somit 10% der Gesamttodesfälle lassen den akuten zerebralen Insult auf Platz 3 der Todesursachen rangieren (Statistisches Bundesamt 2005), weltweit mittlerweile sogar auf Platz 2 (Lopez et al. 2006). Von den 80% der Patienten, welche den Schlaganfall nach vier Wochen überleben, ist ein Drittel zudem dauernd pflegebedürftig und ein weiteres Drittel behält trotz Selbstständigkeit eine Behinderung. Daraus ergibt sich, dass der Schlaganfall schon jetzt in Deutschland die Hauptursache für permanente Behinderungen darstellt. Das Durchschnittsalter für einen zerebralen ischämischen Insult liegt bei Männern bei 70, bei Frauen bei 75 Jahren und stellt einen wichtigen Risikofaktor zur Entstehung eines Schlaganfalls dar (Kolominsky-Rabas und Heuschmann 2002). Die auf eine Lebensdauer berechneten Gesamtkosten pro Fall beliefen sich 2006 auf etwa 43 000 Euro (Kolominsky-Rabas et al. 2006). Durch den Anstieg des Durchschnittsalters der Bevölkerung droht nun eine noch schwerwiegendere ökonomische Belastung, welche die Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen sogar übertreffen kann (Rothwell et al. 2005). Obwohl Inzidenz und Mortalität in den letzten Jahren gesunken sind, steigt die Prävalenz der Erkrankung weiterhin an. Man schätzt, dass schon heute etwa eine Million Menschen in Deutschland an den Folgen eines zerebralen Insults leiden (Wiesner et al. 1999). Experten der WHO sprechen bereits vom Schlaganfall als der kommenden "Epidemie des 21. Jahrhunderts" (Bonita 1998).

Der Begriff „Schlaganfall“ wurde in einer Zeit geprägt als mangels bildgebender Methoden nicht zwischen ischämischem (~85%) und hämorrhagischem (~15%) Insult unterschieden werden konnte. Diese Arbeit befasst sich ausschließlich mit den ischämischen Insulten, bei

denen es durch Obliteration und Stenosierung zerebraler Gefäße primär zur Ischämie des Versorgungsgebietes kommt

2.2 Risikofaktoren für einen Schlaganfall

Die zunehmenden Fallzahlen und die steigenden Folgekosten haben in den letzten Jahren dazu geführt, dass die Forschung in diesem Bereich beträchtlich zugenommen hat. Ein großer Fokus liegt hierbei auf der Entdeckung von Risikofaktoren, um primär- und sekundärprophylaktisch gezielter eingreifen zu können.

Es besteht Konsens darüber, dass ein Schlaganfall besonders durch kardiovaskuläre Vorerkrankungen begünstigt wird. Im Vordergrund steht hier ganz besonders die Arteriosklerose als Ursprung von Thrombembolien, andere Prädispositionen sind unter anderem Vorhofflimmern, Vaskulitiden und zerebrale Mikroangiopathien. Mit einem erhöhten Risiko gehen folglich alle Faktoren einher, welche auch eine Arteriosklerose begünstigen. Alle Risikofaktoren sind dabei zu unterteilen in beeinflussbare und nicht beeinflussbare.

Hohes Alter, männliches Geschlecht und familiäre Disposition stellen unbeeinflussbare Faktoren dar.

Beeinflussbar zeigen sich demgegenüber Hauptrisikofaktoren der Zivilisationsgesellschaft wie Bluthochdruck, Nikotin- und Alkoholkonsum, Hypercholesterinämie (>240 mg/dl), Adipositas (BMI > 30 kg/m²), Bewegungsmangel und bedingt auch die Entstehung eines Diabetes Mellitus (Assmann et al. 2007).

Prophylaktisch kommen hier Allgemeinmaßnahmen wie Gewichtsreduktion, Ernährungsumstellung, Raucherentwöhnung und regelmäßige körperliche Betätigung in Frage, bei denen vor allem Patientenaufklärung und –motivation durch den Arzt eine entscheidende Rolle spielen.

Reicht diese Änderung des Lebensstils nicht aus, müssen medikamentöse Therapien zur Prophylaxe herangezogen werden. Im Vordergrund steht hier die Behandlung der arteriellen Hypertonie, da die Wahrscheinlichkeit einen Schlaganfall zu erleiden kongruent zur Höhe des Blutdrucks ansteigt: jährlich etwa 10% pro 10 mm Hg Blutdruckanstieg (MacMahon und Rodgers 1996). Gleichzeitig kann man durch eine medikamentöse Senkung des Blutdrucks um systolisch 5–6 mm Hg bzw. diastolisch 2–3 mm Hg das Schlaganfallrisiko um 40% reduzieren (Luders und Schrader 2009).

Bei bestehender Hypercholesterinämie wird meist auf HMG-COA-Reduktase-Hemmer (sog. Statine) zurückgegriffen, bei bestehendem Vorhofflimmern wird anhand des CHADS2-Scores das individuelle Risikoprofil für eine kardiogene Embolie abgeschätzt und darauf basierend eine orale Antikoagulation oder ASS-Therapie angesetzt (Fitzmaurice 2009). Dieser Score berechnet sich aus dem Vorliegen einer strukturellen Herzerkrankung und arterieller Hypertonie, hohem Alter, Diabetes Mellitus und vorherigen Schlaganfällen.

Zudem stellen operative Verfahren vor allem beim arteriosklerotischen Befall großer Hirngefäße, wie einer hochgradigen Karotisarterienstenose, eine weitere Option dar.

Auch bei optimaler Compliance des Patienten und bestmöglicher medikamentöser Einstellung kann es dennoch zu einem Schlaganfall mit all seinen Symptomen und Folgen kommen.

2.3 Symptome eines Schlaganfalls

Infolge schlagartig einsetzender Funktionsausfälle des Gehirns treten klinische Symptome auf, welche auf den Fokus des Insults schließen lassen. Je nach Lokalisation der Okklusion, Dauer der Ischämie und dem Bestehen von Kollateralkreisläufen können diese von leichten sensiblen Missempfindungen, über Gesichtsfeldausfälle und Halbseitenlähmung, bis hin zu Koma und Tod ein breites Spektrum an Folgen haben.

Häufigste Lokalisation für einen embolischen Verschluss ist die A. cerebri media (MCA), welche den Hauptast der A. carotis communis darstellt. Sie versorgt auf ihrer jeweiligen Seite etwa 80% des Gehirns, hierbei insbesondere Areale welche für Motorik und Sensorik der gegenüberliegenden Körperhälfte verantwortlich sind. Auf einer Hemisphäre versorgt sie darüber hinaus das Sprachzentrum, welches meist links liegt.

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Obliteration der A. cerebri media rechnet man zusammenfassend vor allem mit kontralateralen faziobrachiokruralen Hemiparesen und Hemiplegien, hemisensiblen Defiziten, homonymen Gesichtsfelddefekten und Blickparesen zur Gegenseite (Mumenthaler 2008a).

Des Weiteren ist in diesem Zusammenhang zur Beurteilung des später benutzten Radialarm-Labyrinth (siehe Kap. 3.4.3) anzumerken, dass es durch Schädigung des Parietallappens auch zur Beeinträchtigung von Orientierung und visuellem Gedächtnis kommen kann (Haring 2002).

2.4 Pathophysiologie des Schlaganfalls

Die Funktion des Gehirns ist für menschliches Leben unersetzlich. Dies bedarf einer großen Menge Energie, was sich in einem Versorgungsprozentsatz von 15% des Herzminutenvolumens niederschlägt. Es bestehen diverse Regulationsmechanismen um die ausreichende Blutversorgung des Gehirns auch unter schwierigsten Bedingungen zu gewährleisten, zum Beispiel kompensatorische Hirnarterioldilatation bei Blutdrucksenkung, Hyperventilation oder erhöhtem intrakraniellen Druck.

Sinkt der Blutdruck im Gehirn dennoch unter einen Schwellenwert (~ 22 ml/100 g Hirngewebe/min) (Mumenthaler 2008b), z.B. aufgrund einer Thrombembolie oder eines systemischen Blutdrucks von unter 70 mm Hg, so besteht in diesen Regionen ein Mangel an Glukose und Sauerstoff. Es kommt zu einer komplexen Aneinanderreihung pathologischer Mechanismen (siehe Abbildung 1).

Aufgrund der Minderversorgung der Zellen und des damit einhergehenden ATP-Mangels fällt die Funktion der energiekonsumierenden Na^+/K^+ -Pumpen dieser Zellen reversibel aus. Es resultiert ein Kaliumaus- bzw. ein Natrium-, Chlorid- und Kalziumeinstrom. Dem Elektrolyteinstrom folgend dringt extrazelluläre Flüssigkeit in die Zellen ein und verursacht eine Schwellung der Zellbestandteile, das sogenannte *zytotoxische Ödem* (Dirnagl et al. 1999).

Des Weiteren wird durch den Energiemangel die Wiederaufnahme von Glutamat in die präsynaptische Membran behindert, so dass die glutamatabhängigen Kalziumkanäle der postsynaptischen Membran aktiviert werden und einen massiven Kalziumeinstrom bewirken. Diese intrazelluläre Kalziumüberladung stellt einen Knotenpunkt für die Aktivierung weiterer pathologischer Signalwege mit übermäßiger Transmitterausschüttung dar, der sogenannten *Exzitotoxizität* (Doyle et al. 2008).

Zum einen verstärkt die Kalziumüberladung den Natriumeinstrom nun noch zusätzlich. Die Zelle depolarisiert weiter und es öffnen sich zusätzliche spannungsabhängige Kalziumkanäle, wodurch ein Teufelskreis entsteht.

Zum anderen aktiviert Kalzium aber auch verschiedene Enzyme: Calpain zerstört beispielsweise das Zytoskelett, die NO-Synthetase und bestimmte Phospholipasen bewirken eine Freisetzung freier Radikale (Chan 2001), Endonukleasen spalten die DNA und Caspase leitet die *Apoptose*, also den programmierten Zelltod, ein (Broughton et al. 2009).

Grundlagen

Der Energiemangel hat zudem noch weitere Auswirkungen. Gleichzeitig zu oben genannten Vorgängen wird bei zerebralen Ischämien eine inflammatorische Reaktion in Gang gesetzt, welche in ihrer Gesamtbedeutung noch nicht endgültig erforscht ist. Der Entzündung werden sowohl förderliche, als auch schädliche Effekte auf die neuronale Genesung zugesprochen (Doyle et al. 2008), worauf in der Diskussion dieser Arbeit eingegangen wird (siehe Kap. 5.4).

Letztlich kommt noch hinzu, dass die Zellen durch den ATP-Mangel vermehrt auf den anaeroben Stoffwechsel zurückgreifen müssen, welcher saures Laktat als Endprodukt hat. Der pH-Wert sinkt und es kommt zu einer Azidose.

Die Summe aus Energiemangel, Azidose und freien Radikalen bedingt schließlich die *Nekrose*, also den unprogrammierten Zelltod.

Vermehrt ausgeschüttete Wachstumsfaktoren leiten im weiteren Verlauf regeneratorsche Umbauprozesse der Ischämieeregionen ein (Hagg 2009). Die Axone der überlebenden Nervenzellen wachsen genauso wieder wie die Synapsen. Auch eine gesteigerte Neubildung von Blutgefäßen ist für die Regeneration wichtig (Beck und Plate 2009). Hinzu kommt, wie im Kapitel 2.8 gezeigt, die Neubildung ganz neuer Neurone, welche für die Interpretation der Wirkung von G-CSF eine besondere Bedeutung hat und unter anderem in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wird. Je nach Ischämiedauer und –intensität kann der entstandene Schaden eines Schlaganfalls dadurch teilweise kompensiert werden.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Unterscheidung zwischen Infarktzone und ischämischer Randzone, genannt *Penumbra*:

In der Infarktzone wird die Durchblutungsschwelle bzw. Infarktschwelle von 8-10 ml/100 g Hirngewebe/min unterschritten. Die Zellen werden irreversibel geschädigt und es entwickelt sich eine Nekrose. Das daran grenzende Gewebe, die Penumbra, ist zwar minderdurchblutet (10-20 ml/100 g Hirngewebe/min), seine Funktion jedoch reversibel wieder herstellbar sofern eine Rezirkulation stattfindet (Dirnagl et al. 1999). Bei Ausbleiben der neuerlichen Blutversorgung leiten die Zellen vornehmlich die Apoptose ein. Auf der Rettung dieses Bereichs sollte der therapeutische Fokus liegen.

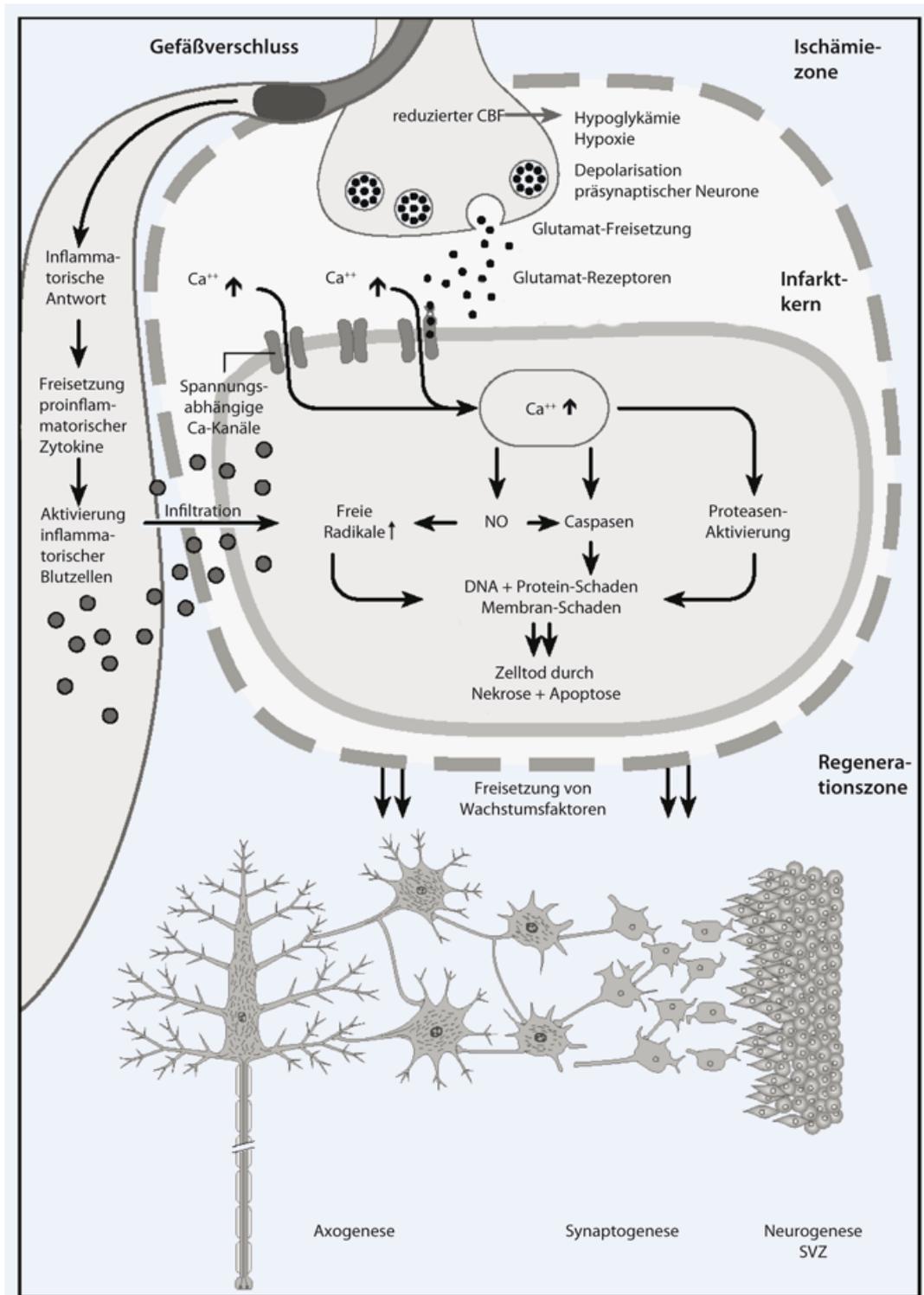


Abb. 1 - Die pathologische Kaskade des Schlaganfallgeschehens (Rogalewski und Schäbitz 2008)

2.5 Aktuelle Schlaganfalltherapie

Durch die Entdeckung der Thrombolyse mittels rekombinatem Gewebsplasminogen-Aktivator (recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA) gibt es eine ursächliche

Behandlungsmöglichkeit. Sofern Kontraindikationen ausgeschlossen sind, zum Beispiel eine Hirnblutung mittels CT- oder MRT-Diagnostik, ist eine systemische intravenöse Thrombolyse innerhalb der ersten 4,5 Stunden nach Symptombeginn durchzuführen (Hacke et al. 2008). Um einen maximalen Therapieerfolg zu erreichen sollte die Thrombolyse in einem anerkannten Schlaganfallzentrum bzw. einer „Stroke Unit“ durchgeführt werden (Heuschmann et al. 2003).

Bis zu sechs Stunden nach dem Ereignis sollte an Schlaganfallzentren auch eine selektive intraarterielle Thrombolyse erwogen werden. Die Wahrscheinlichkeit einer bleibenden Behinderung wird durch beide Verfahren gesenkt, die Mortalität bleibt jedoch unbeeinflusst (NINDS 1995).

Ein bereits angesprochener Nachteil der bisherigen Akuttherapien besteht in dem schmalen Zeitfenster der Medikamentengabe von höchstens 4,5 Stunden nach dem Insult (Grotta 1999). Zum einen konzentrieren sich die aktuellen Forschungen deshalb darauf, die Patienten schneller ins Krankenhaus zu transportieren und die sogenannte „Door-To-Needle-Time“ im Krankenhaus selbst zu minimieren. Als „Door-To-Needle-Time“ wird damit die Zeit bezeichnet, welche zwischen Krankenseintritt und Beginn der Thrombolyse des Patienten vergeht.

Zum anderen liegt ein Fokus der Forschung auf der Entwicklung von Therapeutika, welche ein größeres Zeitfenster bieten.

Wie bereits dargestellt (siehe Kap. 2.4) sind die Vorgänge während eines Schlaganfalls sehr komplex und laufen über viele verschiedene Signalwege ab. In Fachkreisen wird mittlerweile davon ausgegangen, dass somit besonders multimodal in das Schlaganfallgeschehen eingreifende Substanzen mögliche Therapieoptionen darstellen. An dieser Stelle kommt Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin (EPO), dem Stammzellofaktor (SCF), dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und dem in dieser Arbeit untersuchten G-CSF eine besondere Rolle zu (Sprigg und Bath 2007). Diese wirken nicht exklusiv auf einen einzigen Baustein der Pathogenese wie beispielsweise rt-PA, sondern gleichzeitig auf Inflammation, Anti-Apoptose, Angiogenese, Neurogenese und andere Faktoren (Piao et al. 2009).

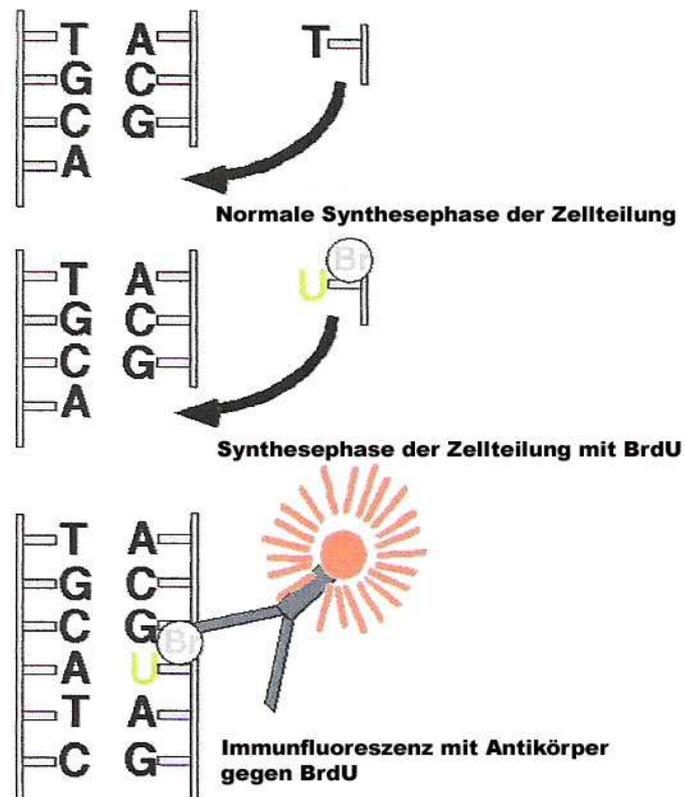
Die Neurogenese muss in diesem Zusammenhang hervorgehoben werden, da sie nicht wie beispielsweise Anti-Apoptose nur den Schaden eines Schlaganfalls begrenzt, sondern vielmehr die entstandenen Schäden im weiteren Verlauf teilweise kompensieren kann.

2.6 Geschichte der Neurogeneseforschung

Bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts galt es in Forscherkreisen nach den histologischen Untersuchungen an Säugetiergehirnen durch den Neuropathologen Santiago Ramon y Cajal als anerkanntes Dogma, dass sich Nervenzellen nach der Geburt nicht mehr vermehren können (Ramon y Cayal 1928). Erst Joseph Altman gelang es 1962 mittels nuklearmedizinischer Verfahren im Gyrus Dentatus und später auch im Bulbus Olfactorius der Ratte zu zeigen, dass zeitlebens neue Neurone gebildet werden und bewies damit die sogenannte *adulte Neurogenese* (Altman 1962, Altman und Das 1965). Über die nächsten 20 bis 30 Jahre wurde diese Erkenntnis jedoch nicht vollwertig anerkannt. Erst die Erforschung von 5-Bromodesoxyuridin (BrdU, siehe Kap. 2.7), mit welchem man auch durch einfache Immunhistochemie neue Zellen nachweisen konnte, brachte die Wissenschaft bedeutend weiter. In Studien von Kuhn und Kempermann in den 1990er Jahren (Kuhn et al. 1996, Kempermann et al. 1997) wurde mittels BrdU-Färbung und konfokaler Mikroskopie Neurogenese bei Nagetieren quantitativ und qualitativ untersucht. 1998 wiesen Eriksson et al. dann auch adulte Neurogenese bei Menschen bis zu einem Alter von 72 Jahren nach (Eriksson et al. 1998).

2.7 BrdU (5-Bromo-2-Desoxyuridin)

Das Thymidinanalogon 5-Bromo-2-Desoxyuridin, kurz BrdU, hat sich seit seiner Einführung als Goldstandard zum Nachweis neugeborener Zellen etabliert. Es eignet sich gut, um innerhalb eines definierten Zeitraums neugeborene Zellen zu markieren. Nach der Injektion baut sich BrdU während einer Zellteilung in der DNA-Synthesephase (S-Phase) anstelle einer Thymidinbase in die DNA ein. Das somit markierte Erbgut einer neuen Zelle kann nun immunhistochemisch mithilfe eines Antikörpers gegen BrdU licht- oder fluoreszenzmikroskopisch dargestellt und die Zellkerne quantitativ ausgewertet werden (Abbildung 2).



**Abb. 2 - Markierung der DNA neugeborener Zellen mit BrdU
(Kempermann et al. 1998)**

Kombiniert man nun eine BrdU-spezifische Färbung mit einer neuronenspezifischen Färbung (in unserem Fall NeuN), so lassen sich explizit neugeborene Neurone darstellen. Genau diese Technik führte schon 1998 zum Beweis der humanen adulten Neurogenese (Eriksson et al. 1998) und ermöglicht heute weitergehende Forschungen in diesem Bereich. Das Wissen über adulte Neurogenese konnte so in den letzten Jahren beträchtlich wachsen.

2.8 Grundbegriff „Adulte Neurogenese“

Spricht man heutzutage von Neurogenese, so meint man die Proliferation und Differenzierung multipotenter neuronaler Stammzellen. Neuronale Stammzellen zeichnen sich durch drei Eigenschaften aus:

- 1) Sie können Nervengewebe generieren oder leiten sich vom Nervensystem ab;
- 2) Sie haben eine Kapazität zur Selbsterneuerung;
- 3) Sie können durch asymmetrische Zellteilung andere Zellen als sich selbst hervorbringen (Gage 2000).

Neuronale Stammzellen sind nicht zu verwechseln mit pluripotenten embryonalen Stammzellen, welche im Gegensatz zu ihnen weitaus mehr Differenzierungsmöglichkeiten haben. Aus den neuronalen Stammzellen können sich dann drei differenziertere Zelllinien entwickeln: Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten.

Diese Vorgänge beschränken sich jedoch beim Menschen auf zwei Bereiche des Gehirns, welche Reste des embryonalen Neuralrohrs darstellen:

a) Die Subventrikuläre Zone (SVZ)

Die SVZ ist ein schmales Band von Zellen, welches sich lateral an die Seitenventrikel schmiegt. Hier entstehen aus langsam proliferierenden Neuroblasten (sog. B-Zellen) die letztendlich migrationsfähigen Formen, sog. A-Zellen. Diese wandern entlang des Rostralen Migratorischen Stroms (RMS) von der SVZ in den olfaktorischen Bulbus (Doetsch et al. 1997, Doetsch und Scharff 2001) wo sie sich zum Teil zu Neuronen und Astrozyten weiter differenzieren (Lois und Alvarez-Buylla 1993).

b) Der Gyrus Dentatus des Hippokampus

Der Hippokampus ist Teil des limbischen Systems. Er wird auch als „Tor zum Gedächtnis“ bezeichnet, da hier neu aufgenommene Informationen weiter verarbeitet werden, bevor sie dann im Neokortex ins Langzeitgedächtnis gespeichert werden. In seiner Subgranulären Zone (SGZ) teilen und differenzieren sich bestimmte GFAP-positive Astrozyten zu neuen Neuronen (Seri et al. 2001) und siedeln sich in der Körnerzellschicht an. Studien der letzten Jahre zeigten, dass diese Neurone auch funktionell eingegliedert werden (van Praag et al. 2002, Kempermann et al. 2004).

Die Neurogenese in diesen Bereichen unterliegt einem komplexen Steuerungsprogramm, welches in all seinen Facetten noch nicht gänzlich entschlüsselt ist (siehe Diskussion). Grundbestandteil dieser Arbeit ist jedoch die Erkenntnis, dass sie durch G-CSF angeregt wird (Schneider et al. 2005).

2.9 Der Granulocyte-Colony-Stimulating Factor (G-CSF)

Der Granulocyte-Colony-Stimulating Factor (G-CSF, übersetzt „Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor“) ist ein 19,6 kDa großes, endogen produziertes Glykoprotein, welches sich aus 174 bzw. 177 Aminosäuren aufbaut (Souza et al. 1986, Nagata et al. 1986). G-CSF agiert an CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen und reguliert die Proliferation, Differenzierung und Mobilisation von Vorstufen neutrophiler Granulozyten (Sprigg et al. 2006) indem es an den G-CSF-spezifischen Rezeptor (G-CSFR; CD114) bindet (Hartung 1998). G-CSF kann je nach Situation in verschiedenen Geweben produziert werden. Hauptverantwortlich für die endogene Produktion sind hämatopoetische Zellreihen wie Monozyten/Makrophagen (Vellenga et al. 1988) und Lymphozyten, aber auch in anderen Zellen wie Mesothelialzellen (Demetri et al. 1989), Fibroblasten (Koeffler et al. 1987) und Endothelzellen (Zsebo et al. 1988) wurde eine G-CSF-Produktion schon beobachtet. Zusätzlich wird G-CSF in einer Reihe von Tumoren wie Blasen- und Ösophaguskarzinomen (Welte et al. 1985, Ichiishi et al. 2000), Melanomen (Lilly et al. 1987) und Glioblastomen (Tweardy et al. 1987) produziert. Vom menschlichen Körper wird G-CSF vor allem in körperlichen Stresssituationen wie einer Sepsis (Kawakami et al. 1990) oder dem Systemisch-Inflammatorischem Response-Syndrom (SIRS), aber auch nach akuten Myokardinfarkten (Wojakowski et al. 2004) und einer Reihe anderer Erkrankungen vermehrt ausgeschüttet (Watari et al. 1989).

Der zugehörige spezifische und hoch-affine Rezeptor, zuerst charakterisiert durch Nicola et al 1985 (Nicola und Metcalf 1985), ist vor allem auf neutrophilen Granulozyten aller Stadien zu finden, zudem auf Monozyten, Thrombozyten, Endothelialzellen (Boneberg et al. 2000) und auch Neuronen (Schneider et al. 2005). Seine Expression wird durch G-CSF selbst gefördert (Boneberg und Hartung 2002b).

Noch sind nicht sämtliche Funktionen von G-CSF bekannt. Zwar sind die ursprünglichen Effekte von G-CSF hinsichtlich Neutrophilenproliferation und –differenzierung genau erforscht (Metcalf und Nicola 1983), doch zeigt sich die Gesamtwirkung von G-CSF auf

Grundlagen

andere Körpersysteme deutlich komplexer und vielfältiger. Seit Jahren wird G-CSF schon aufgrund seines Stammzell-mobilisierenden Effekts bei der Chemotherapie-induzierten Neutropenie und Knochenmarkstransplantationen präventiv und therapeutisch eingesetzt (Sheridan et al. 1989, Frampton et al. 1994).

G-CSF moduliert hinzukommend die Zytokinreaktion (Boneberg und Hartung 2002a) und verbessert die Effektorfunktion neutrophiler Granulozyten (Roberts 2005, Weiss et al. 1996). Gleichzeitig wirkt es hemmend auf die Apoptose dieser Zellen und fördert somit ihr Überleben (Begley et al. 1986, Hu und Yasui 1997).

Tierexperimentelle Studien der letzten Jahre lassen vermuten, dass G-CSF auch eine wichtige Rolle für das Zentrale Nervensystem (ZNS) spielen kann. In diversen experimentellen Arbeiten wurde bereits bei jungen Nagetieren gezeigt, dass G-CSF die adulte Neurogenese fördert, starke anti-apoptotische Aktivität bei adulten Neuronen besitzt und zudem multiple Zellüberlebenskaskaden aktiviert (Minnerup et al. 2008, England et al. 2009). Dies wird ermöglicht, indem G-CSF zum einen die Blut-Hirn-Schranke passiert und zum anderen seine Rezeptoren von Neuronen und neuronalen Stammzellen exprimiert werden (Schneider et al. 2005). Die detaillierte Wirkungsweise wird am Ende dieser Arbeit bei der Diskussion der Ergebnisse dieser Studie erläutert und diskutiert.

3 Material & Methoden

3.1 Tiere

Wir benutzten hauseigen gezüchtete, 19 bis 20 Monate alte, männliche Sprague-Dawley-Ratten. Das Projekt wurde mit 29 alten Ratten begonnen, 14 in der Placebogruppe, 15 in der mit G-CSF behandelten Gruppe. Die Zahlen im Ergebnisteil beziehen sich auf die Anzahl der Tiere, welche sowohl den chirurgischen Eingriff überlebt als auch die 4-wöchige Testperiode vollständig absolviert haben.

Die Tiere wurden vom Institut für Neurologie der Universität Greifswald bereitgestellt. Ihr Körpergewicht reichte von 520 g bis 600 g. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen, d.h. die Temperatur betrug durchweg 22°C, die Luftfeuchtigkeit 40-60% und die Lichtperiode dauerte täglich von 7 bis 19 Uhr. Die Tiere wurden isoliert voneinander in Standardkäfigen bei freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten.

Die in dieser Studie dargestellten Experimente wurden in Übereinstimmung mit den Regelungen des Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung durch ein staatliches Tierschutzkomitee der Universität Greifswald durchgeführt. Die Arbeit wurde am 25.11. vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-052/08).

3.2 Operation (Permanent Transcranial Middle Cerebral Artery Occlusion)

Um die Ergebnisse dieser tierexperimentellen Arbeit für zukünftige Forschungen am Besten auf den Menschen übertragen zu können, versuchten wir bei der Planung des operativen Eingriffs dem „natürlichen“ Schlaganfall beim Menschen möglichst nah zu kommen. Wie Kap. 2.3 bereits beschrieben, stellt ein Verschluss der A. cerebri media beim Menschen die häufigste Infarktlokalisierung dar. Dabei ist die spontane Reperfusionrate mit nur etwa 20% beim Menschen gering (Hacke et al. 2005b). Wir entschieden uns somit für einen permanenten, operativen Verschluss der A. cerebri media mittels Elektrokoagulation.

Das Operations- und Fixationsschema orientierte sich an den Arbeiten von Badan et al. aus dem Jahr 2003 (Badan et al. 2003), wenngleich dort transient okkludiert wurde.

Zur Minimierung der Vielzahl an ischämischen Schäden aufgrund variierender Plasmaglukoselevel und der gleichzeitig bestehenden Aspirationsgefahr wurde den Ratten 18

Stunden präoperativ die Nahrung entzogen, Wasser stand weiterhin zur freien Verfügung. Jede Operation wurde zwischen 9 und 13 Uhr durchgeführt.

Die rechte A. cerebri media (MCA) wurde transkraniell durch einen mit einem Mikromanipulator (Maerzhaeuser Precision Micro-Manipulator Systems, Fine Science Tools) verbundenen Wolframhaken angehoben und elektrokoaguliert (Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO). Da aufgrund von ausgedehnten Kollateralkreisläufen bei der Ratte eine adäquate Infarktgröße durch einen alleinigen Verschluss der A. cerebri media nicht zu erreichen wäre, verschlossen wir jeweils daran anschließend mittels einer vorher platzierten Fadenschlaufe beide Aa. Carotis communis (Popa-Wagner et al. 1998). Das operative Feld wurde mit künstlichem Liquor cerebrospinalis (Liquicheck, Spinal Fluid Control, BioRad) feucht und warm gehalten. Während des gesamten Eingriffs wurde die Anästhesie durch spontane Inhalation von einem Gemisch aus 1-1,5% Halothan, 75% Stickstoffoxid und 25% Sauerstoff aufrechterhalten. Die anästhesierten Tiere wurden in Rückenlage fixiert. Ein homeothermisches Abdecksystem (Harvard Apparatus) hielt die Körpertemperatur stabil bei 37°C. Die lokalen Blutflussunterschiede wurden von einem Laser-Dopplergerät (Perimed, Stockholm, Schweden) überwacht und die Schwanzarterie katheterisiert damit sowohl der Blutdruck gemessen als auch Blut entnommen werden konnte. Hiermit ließen sich dann der pH-Wert und arterielle Blutglukoselevel (Omnican7 Balance, B. Braun, Melsungen) bestimmen. Zusätzlich wurden noch die Blutgase (Blutgassystem IL 1620, Instrumentation Laboratory, München) während der Ischämiephase an verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Diese Werte variierten zwischen der später mit G-CSF behandelten und der mit Placebo behandelten Gruppen nicht (siehe Tabelle 1).

Ein Absinken des Laser-Doppler-Signals auf unter 20% des Kontrollwerts wurde als erfolgreiche MCAO angesehen. Schlussendlich wurden die Aa. carotis communis nach 90 Minuten wieder geöffnet.

Zur Minimierung eines Infektionsrisikos wurde die gesamte Operation unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Des Weiteren wurden die Tiere mit befeuchteten Futterkugeln gefüttert um den alten Tieren das Fressen zu erleichtern.

	Zeitpunkt	Kontrolle	G-CSF
pH	Prä-OP	7.40±0.04	7.38±0.02
	Intra-OP	7.34±0.01	7.36±0.03
Pco₂ in mm Hg	Prä-OP	43.±1.34	45.3±2.34
	Intra-OP	47.6±2.94	46.3±3.54
Po₂ in mm Hg	Prä-OP	192±29	189±27
	Intra-OP	171±28	177±39
Blutdruck in mm Hg	Prä-OP	130±9	128±7
	Intra-OP	110±9	115±12
Blutglukose in mg/dL	Prä-OP	3.6±0.5	3.8±0.5
	Intra-OP	3.9±0.7	4.0±0.8

Tab. 1: Analyse von pH-, Blutgas-, Blutdruck und Blutglukosewerten

3.3 G-CSF-Behandlung und BrdU-Markierung

Eine Stunde nach der Wiedereröffnung des zerebralen Blutkreislaufes wurde bei der Behandlungsgruppe (n=15) die G-CSF-Behandlung mit einer subkutanen G-CSF-Dosis von 15 µg/kg Körpergewicht (Amgen, München) gestartet und danach täglich für 15 Tage weitergeführt. Dieses Behandlungsschema ist ähnlich zu dem Vorgehen in vorherigen Studien zur Genesung junger Ratten nach Schlaganfällen (Schneider et al. 2005, Schneider et al. 2006) und erscheint klinisch sicher und durchführbar. Die Kontrollgruppe bestand aus im Alter übereinstimmenden Tieren (n=14) und wurde ausschließlich mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt.

Um neugeborene Zellen zu markieren wurde den Ratten zudem in der ersten Woche nach Schlaganfall einmal täglich und in der zweiten Woche jeden zweiten Tag eine intraperitoneale Injektion mit 5-Bromodesoxyuridin (BrdU, 50 mg/kg KG, Sigma-Aldrich, München) gespritzt, somit insgesamt über einen Zeitraum von 14 Tagen.

Die Injektionen wurden ohne Narkose durchgeführt, da eine etwaige Äthernarkose für die Tiere belastender gewesen wäre als die Injektion selbst. Die Stressbelastung sollte minimal gehalten werden.

3.4 Verhaltenstests

Um Ischämie-assoziierte Veränderungen hinsichtlich eines G-CSF-Effekts zu beurteilen, wurden die Ratten sowohl vor als auch nach der MCAO drei unterschiedlichen

Verhaltenstests bezüglich somatosensorischen, motorischen und räumlichen Denkens und Gedächtnisses unterzogen. Diese kamen schon in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe zum Einsatz (Buchhold et al. 2007).

Die gesamten Testprozeduren involvierten drei Mitarbeiter, wovon einer ausschließlich für die chirurgischen Eingriffe zuständig war und die Tiere den Kontroll- und Testgruppen zuordnete. Eine weitere Mitarbeiterin wurde über die Zuteilung der einzelnen Tiere im Unklaren gelassen und war für die Verhaltenstestung zuständig. Eine dritte Person war später für die immunhistochemischen Untersuchungen eingeteilt.

Alle Testungen wurden zwischen neun und elf Uhr morgens von demselben Untersucher durchgeführt. Die Ergebnisse vor dem chirurgischen Eingriff wurden als 100%-Index für jedes Tier bei den einzelnen Tests definiert und die funktionelle Erholung wurde als Prozentwert der Erholung im Vergleich zum Grundwert vor dem chirurgischen Eingriff ausgedrückt.

Anzufügen ist, dass bei keinem der Verhaltenstests den Tieren Schaden zugefügt wurde. Die Ratten wurden beispielsweise bei Drehbalken- und Schrägflächentest jeweils aufgefangen, bevor sie herunterfielen.

3.4.1 Drehbalkentest (Rotating Pole)

Der Drehbalkentest beurteilt Koordination und sensomotorische Funktion im MCAO-Modell (Goldstein 1993, Alexis et al. 1996). Jede Ratte wurde damit konfrontiert, einen waagerechten, runden Balken mit einer Länge von 140 cm und einem Durchmesser von 7,5 cm längs zu überqueren, während dieser durch einen Motor mit 6 U/min gedreht wurde (siehe Abbildung 3). Unter dem 50 cm über dem Boden befindlichen Balken lag eine Schaumstoffmatte um den Sturz eines Tieres im Notfall abzufedern. Beim Drehbalkentest behalten Ratten normalerweise bei der Überquerung ihre Pfoten symmetrisch auf dem oberen Bereich des Balkens. Auf der Zielseite des Balkens befand sich der eigene Käfig mit Futter, welcher als Anreiz diente.

In unserer Studie wurden zwei Variablen bewertet: Quantitativ die für die Überquerung benötigte Zeit und qualitativ auf einer Skala von 0 bis 6 die Art der Überquerung.

0 = Ratte fällt sofort vom Balken

1 = Ratte bewegt sich nicht vorwärts, bleibt jedoch auf dem Balken

2 = Ratte bewegt sich vorwärts, fällt jedoch vor dem Ziel vom Balken

3 = Ratte überquert den Balken, benutzt jedoch ihre Extremitäten asymmetrisch

Material & Methoden

- 4 = Ratte überquert den Balken, das linke Hinterbein wird dabei jedoch weniger als 50% der Zeit benutzt
- 5 = Ratte überquert den Balken, jedoch mit einigen Schwierigkeiten
- 6 = Ratte überquert den Balken mit symmetrischen Bewegungen ohne Fehler

Jeder Test bestand aus fünf aufeinander folgenden Durchgängen, wovon der Mittelwert bestimmt wurde.

Die Ratten wurden innerhalb der letzten zwei Wochen vor dem operativen Eingriff in dieser Übung trainiert um ihnen ein späteres erfolgreiches Überqueren zu erleichtern.



Abb. 3 – Drehbalkentest (Buchhold 2007)

3.4.2 Schrägflächentest (Inclined Plane)

Wir testeten die motorische Fähigkeit jedes Tieres, den Stand auf einer Schrägfläche von gegebenem Winkel zu halten (Rivlin und Tator 1977). Die Ratten wurden auf eine 40 x 40 cm große Fläche gesetzt, welche dann auf einer Seite kontinuierlich elektrisch angehoben wurde (siehe Abbildung 4). Der relative Winkel an welchem die Ratten ihren Stand nicht mehr halten konnten, wurde als Maß des funktionellen Schadens gewertet. Auch hier wurde ein Tagesmittelwert aus fünf Durchgängen ermittelt. Dieser Test wurde einmal vor der Operation und danach täglich durchgeführt.



Abb. 4 – Schrägflächentest (mod. aus Buchhold 2007)

3.4.3 Radialarmlabyrinth (Radial-Arm Maze)

Die Ratten wurden mittels eines 60 cm über dem Boden befindlichen Radialarmlabyrinths getestet, dessen acht Arme von einer oktagonalen Startfläche ausgingen. Die Arme waren von der zentralen Startfläche (Durchmesser 35 cm) durch Klapptüren getrennt und jeder Arm war mit farbigen geometrischen Figuren über der Klappe als Hinweis markiert um den Tieren eine visuelle Orientierung zu ermöglichen (siehe Abbildung 5).

Hungrige Ratten wurden in einen der Arme gesetzt, welcher jedes Mal als Startkompartiment fungierte. Während des Versuchs mussten sich dann die Ratten erinnern, welcher der sieben verbliebenen Arme im Testdurchlauf vorher der Zielarm war. Dieser mit Futter präparierte Zielarm blieb bei jedem Tier gleich (Olton und Papas 1979, modifiziert von Buchhold et al. 2007). Wir bestimmten einen Einzelscore von 0 für das erfolgreiche Finden des Zielarms und von 1 für einen Misserfolg. Jeder Versuch bestand aus zwei Läufen innerhalb von 20 Minuten. Zwei aufeinander folgende erfolgreiche Durchgänge ergaben einen Gesamtscore von 0. Ein bzw. zwei Fehlversuche resultierten gleichermaßen in einem Score von 1.

Vor der Operation fanden bei diesem Test keine Trainingsdurchgänge statt. Das Labyrinth wurde geruchsfrei gehalten und sowohl während als auch nach jedem Testdurchlauf eines Tieres mit Alkohol gesäubert.



Abb. 5 – Radialarmlabyrinth (Buchhold 2007)

3.5 Anfertigen der Gewebsschnitte

Nach einer postoperativen Überlebenszeit von 28 Tagen wurden die Ratten mit einem Gemisch aus 2,5% Halothan in 75% Stickstoffoxid und 25% Sauerstoff tief betäubt. Dann wurden sie zuerst mit neutral gepufferter NaCl-Lösung und hinterher mit gepufferter 4%iger, frisch depolymerisierter Paraformaldehyd-Lösung (PFA) perfundiert. Jedes Gehirn wurde entfernt und schließlich in gepufferter 4%iger PFA-Lösung für 24 Stunden nachfixiert. Als Gefrierschutzmittel verwendeten wir dann 15% Glycerol in 10 mmol/l Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS), bevor die Gehirne in Isopenthan eingefroren und bis zum Schneiden bei -70°C gelagert wurden.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Gehirne per Kryostat (Leica Mikrotom CM 3000) bei einer Temperatur von -30°C koronar mit einer Dicke von 25 µm bzw. 50 µm geschnitten und so fast vollständig aufgeteilt. Dabei wurde strikt Protokoll geführt. Die Schnitte wurden über das Infarktgebiet hinaus (jeweils 20 Schnitte mehr) freischwimmend in 4%iger, gepufferter PFA-Lösung aufgenommen und fixiert. 30 min (25 µm dicke Schnitte), bzw. 60 min (50 µm dicke Schnitte) später wurden sie dreimal in 1x PBS-Lösung gewaschen und dann bis zur weiteren Analyse in Gefrierschutzlösung bei -20°C gelagert. Mittels einer Kresylviolett-Schnellfärbung ließ sich die aktuelle Schnittebene des Gehirns bestimmen. Hierzu wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Daraufhin wurde eine Kresylviolettlösung aufgetropft, nach 20 Sekunden abgeklopft und die Schnitte mit autoklaviertem Wasser gespült. Per Lichtmikroskopie ließ sich dann eine Aussage über die Schnittebene treffen (Buchhold et al. 2007).

3.6 Erfassung des Infarktvolumens

Um die durch permanente fokale Ischämie verursachte Infarktgröße zu erfassen, wurde jeder 20. Schnitt mit NeuN-Antikörpern (Millipore, Schwalbach) gefärbt, einem Marker intakter Neurone. Wie in vorherigen Arbeiten von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, ist ein Wegfall der NeuN-Markierung ein verlässlicher Indikator für den Neuronenuntergang (Buchhold et al. 2007). Die Morphologie lebensfähiger Neurone wurde somit zur Eingrenzung der Infarktregion benutzt (Badan et al. 2003).

Fotos der gefärbten Schnitte wurden gemacht um die Gesamtfläche des Infarkts zu erfassen, die dann als die Summe von Teilbereichen mittels Scion®-Bildanalysesoftware exakt berechnet wurde (siehe Abbildung 6). Die Integration der resultierenden Partialvolumina

ergab schließlich das Totalvolumen der ipsilateralen Hemisphäre mit Gesamtvolumen des Infarkts:

$$\begin{aligned} & \text{Fläche der Teilbereiche} \times \text{Anzahl der Schnitte} \times \text{Schnittdicke} \times \text{Schnittintervall} \\ & = \text{Totalvolumen} \end{aligned}$$

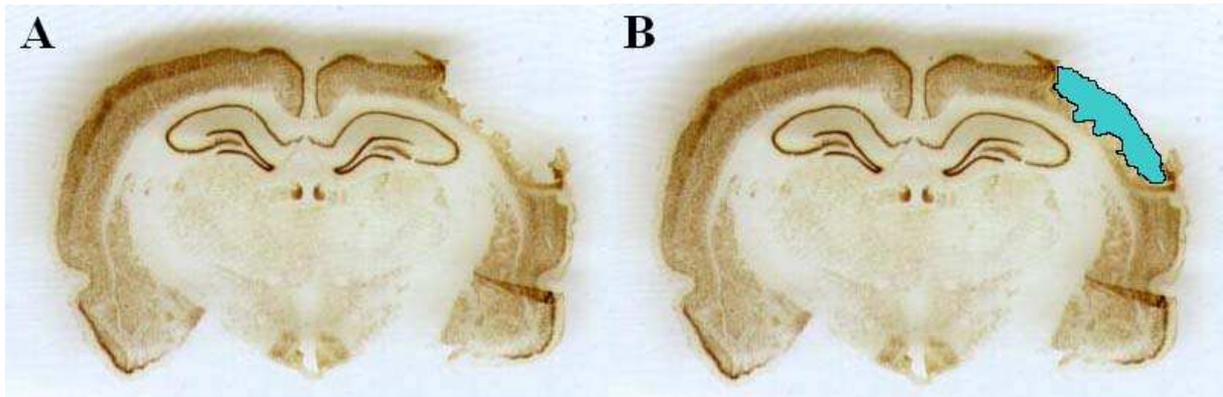


Abb. 6 - NeuN-gefärbter Gehirnschnitt mit Gewebeschaden (A) und markierter Infarktfäche (B) (mod. aus Buchhold 2007)

3.7 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung

Angelehnt an die Arbeit von Popa-Wagner et al. von 2007 (Popa-Wagner et al. 2007) wurden alle untersuchten Gewebsschnitte nach demselben Schema im Free-Floating-Verfahren gefärbt: Zur Erkennung neugeborener Zellen wählten wir BrdU, zur Erkennung von Neuronen NeuN. Beim Free-Floating-Verfahren befinden sich die Gehirnschnitte während des gesamten Färbeprozesses frei schwimmend in den Lösungen und werden erst nach abgeschlossener Färbung auf Objektträger aufgezogen. Dies ermöglicht dem Gewebe einen gleichmäßigeren Kontakt mit den Reagenzien.

Formalin-fixierte Kryostatschnitte mit einer Dicke von 25 µm wurden zuerst 15 Minuten in PFA fixiert und dann mittels PBS ausgiebig gewaschen. Nach der Inkubation mit 50% Formamid/2x SSC. für 2 Stunden bei 60°C wurden sie wieder gewaschen, zuerst mit 2x SSC dann mit 10x PBS. Nach der Denaturierung in 2N HCl bei 37°C über 40 Minuten wurde 0,1M Boratpuffer (pH 8,5) für 30 Minuten zur Neutralisierung hinzu gegeben. Daraufhin wurden die Schnitte dreimal mit 10x PBS und dreimal mit 1x PBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen verwendeten wir ein Gemisch aus 0,3% Tween-20 und 5% Ziegen Serum in PBS über eine Dauer von 2 Stunden. Statt 5%igen Ziegen Serums benutzten wir in der Lösung während der 24-stündigen Inkubation des ersten Primärantikörpers (Ratte anti-BrdU) bei 4°C 3%iges Ziegen Serum. Am zweiten Tag wurden die Schnitte zuallererst

ausgiebig gewaschen, bevor sie für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem ersten fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 594 Ziege anti-Ratte) inkubiert wurden. Nach einem weiteren Waschschrift wurde für die Doppelimmunfluoreszenz das Gewebe bei 4°C über Nacht mit einem NeuN-Antikörper (Maus anti-NeuN) inkubiert. Am dritten Tag wurden die Schnitte wieder ausgiebig in PBS gewaschen, bis hinterher für zwei Stunden ein zweiter fluoreszierender Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Maus) hinzu gegeben wurde. Nach einem finalen Waschschrift wurden die Schnitte auf Superfrost Plus® Objektträger aufgezogen und mit DAPI enthaltendem Vectashield®-Einbettungsmedium gedeckelt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff (4',6-Diamidin-2-phenylindol), welcher relativ spezifisch DNA färbt und somit Zellkerne blau darstellt. Er wird in der heutigen Immunfluoreszenzmikroskopie häufig und gerne eingesetzt, weil er einer einfachen Färbetechnik bedarf und sein Emissionsmaximum am kurzwelligen Ende des Lichtspektrums liegt. Somit lässt es sich sehr leicht mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen, welche z.B. grün oder rot fluoreszieren, kombinieren.

3.7.1 Verwendete Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Ratte anti-BrdU	1:250	Abcam, Cambridge, UK
Alexa Fluor® 594 Ziege anti-Ratte IgG	1:250	Invitrogen, Karlsruhe
Sekundärantikörper		
Maus anti-NeuN	1:500	Millipore, Schwalbach
Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Maus IgG	1:500	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 2 – Verwendete Antikörper

3.7.2 Weitere Färbematerialien

1x PBS:	Trockenpulver Instamed® 9.55 g/l PBS Dulbecco ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (Biochrom GmbH, Berlin)
10x PBS	10x Trockenpulver Instamed® 9.55 g/l PBS Dulbecco ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (Biochrom GmbH, Berlin)

Material & Methoden

4%iges PFA:	Roti®-Histofix 4% (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Ziegenserum:	Cytogen, Costar, Bodenheim
2x SSC:	800 ml H ₂ O 17,5 g NaCl 8,82 g Sodium Citrate ad 1 l
Tween-20 0,3%:	3 ml Tween-20 auf 1 l Aqua dest.
0,1M Boratpuffer, pH 8,5:	3,8 g Natriumborat (MW 381, Di-Na-Tetraborat-decahydrat) in 100 ml Aqua dest.
2N HCl:	4 ml 37%ige HCl auf 70 ml Aqua dest.
50% Formamid:	100 ml Formamid auf 100 ml Aqua dest.
Vectashield®:	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA (Einbettungsmedium mit DAPI)
Objektträger:	Superfrost Plus Slides®, R.Langenbrink – Labor und Medizintechnik, Emmendingen

3.8 Auszählungsprozeduren

BrdU-positive Zellen wurden in drei Gehirnregionen analysiert:

1. Periinfarktareal
2. Subventrikulärer Zone (SVZ)
3. Gyrus Dentatus

Für die Periinfarktauswertung wurden vier Quadrate (300 µm x 300 µm), welche direkt an die Infarktzone grenzten, in jeweils vier Gehirnschnitten pro Tier stereologisch analysiert. Die Größe der Auszählfenster betrug 70 µm x 70 µm und der Auszählbereich reichte von Bregma

Material & Methoden

1 mm bis -0,4 mm (siehe Abbildung 7, rot). Für die Subventrikuläre Zone wurden bei denselben Schnitten mit dem semiautomatischem Stereologiesystem (StereoInvestigator, MicroBrightField, Colchester, VT, USA) jeweils vier an die lateralen Seiten des dritten und vierten Ventrikels angrenzende Rechtecke (260 μm x 60 μm ; Auszählfenster 70 μm x 70 μm) untersucht (siehe Abbildung 7, blau).

Aufgrund der geringen Anzahl BrdU-positiver Zellen bei alten Ratten wurde der Gyrus Dentatus analog ausgezählt. Hierzu wurde mithilfe von DAPI-Fluoreszenz die Grenze des Gyrus Dentatus detektiert. Die somit umzogene Gesamtfläche wurde dann vollständig bei jeweils drei Schnitten (Bregma 2,6 bis -3,4) quantitativ nach BrdU-positiven Zellen untersucht.

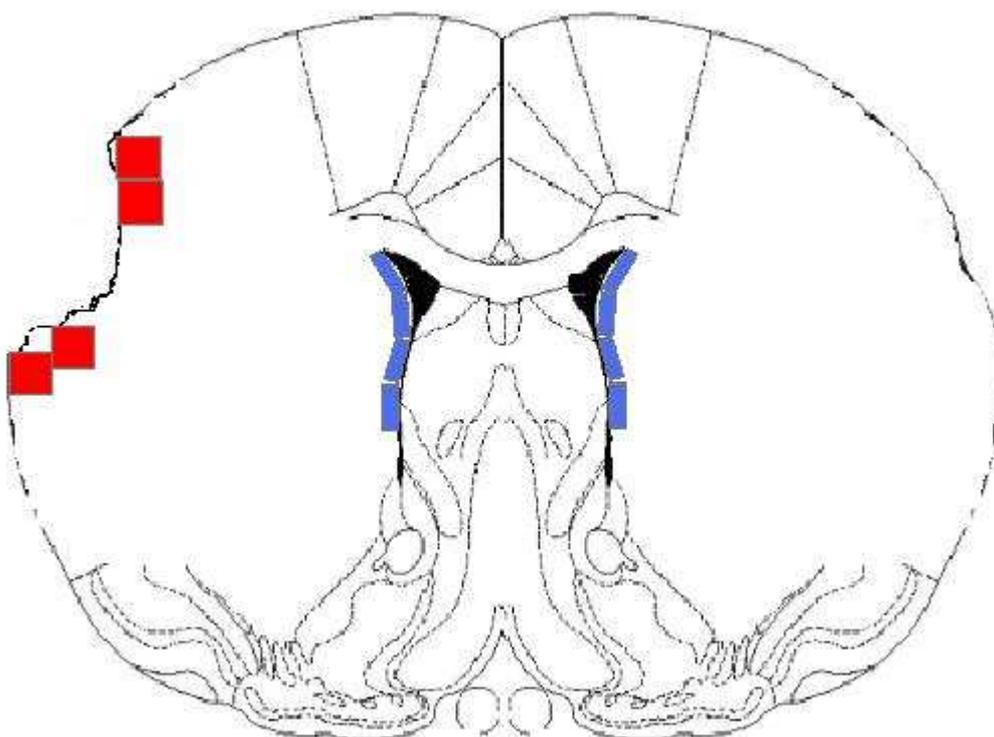


Abb. 7 - Die Lokalisation der Auszählfenster im Periinfarktarea (rot) und in der Subventrikulären Zone (blau)

Um abzuschätzen wie viele dieser Zellen neugeborene Neurone waren, wurden 20 zufällig ausgewählte BrdU-positive Zellen (rot fluoreszierend) pro Region bei jedem Tier auf gleichzeitige NeuN-Markierung (grün fluoreszierend) untersucht (siehe Abbildung 8). Der hier ermittelte Prozentsatz doppelt markierter Zellen wurde dann mit der Gesamtanzahl an BrdU-positiven Zellen pro Region multipliziert. Somit erhielten wir eine hochgerechnete Angabe über die Anzahl neugeborener Neurone in jeder Region.

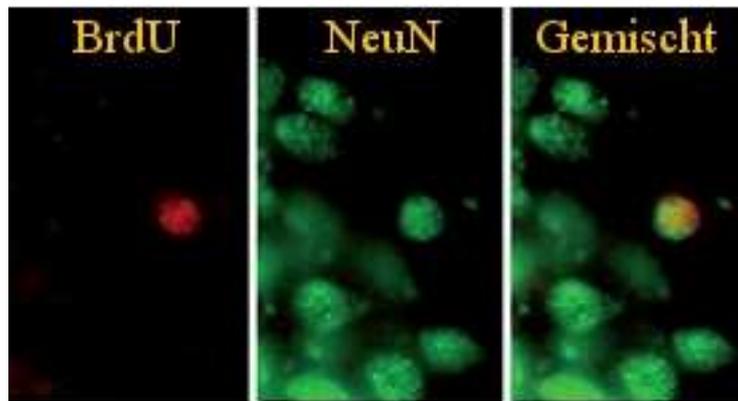


Abb. 8 - BrdU-positive Zelle (links), NeuN-positive Zelle (Mitte), BrdU-NeuN-doppelpositive Zelle (rechts)

3.9 Statistische Analyse

Die Haupteffekte, sowohl hinsichtlich der Behandlung und Zeit als auch der Interaktionen der zwei Faktoren auf die Genesung, wurden mithilfe einer MANOVA-Studie (Multivariate Analyse der Varianz) für jede Messung evaluiert, wobei „Behandlung“ als „between subject“-Variable und „Zeit“ als „within subject“-Variable festgelegt wurde.

Zur nicht-parametrischen Datenanalyse nutzten wir den Kruskal-Wallis-Test, welcher für multiple unabhängige Messungen entwickelt wurde. Anschließend wurde noch eine Bonferroni-Korrektur für Alphafehler (SPSS Inc., Chicago, IL) berechnet.

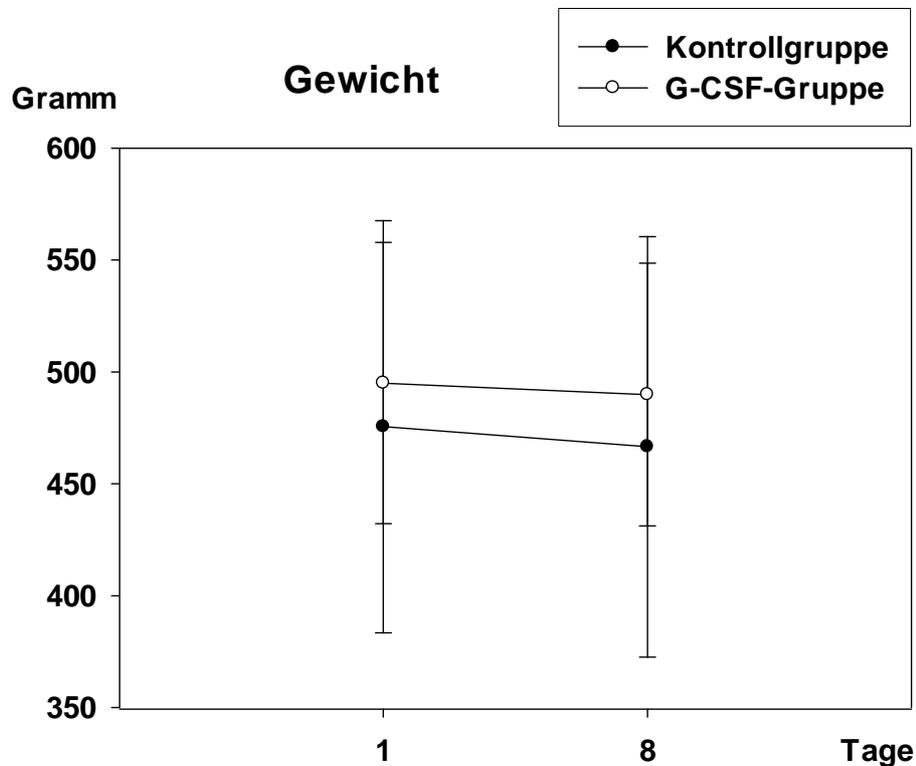
Als Ranganalyse der Mortalität benutzten wir den Mantel-Cox-Test, die Neurogenese wurde mithilfe einer Varianzanalyse bewertet. Ein p-Wert (Wahrscheinlichkeitswert) von unter 0,05 wurde hierbei als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Generelle Beobachtungen

4.1.1 Gewichtsverlauf

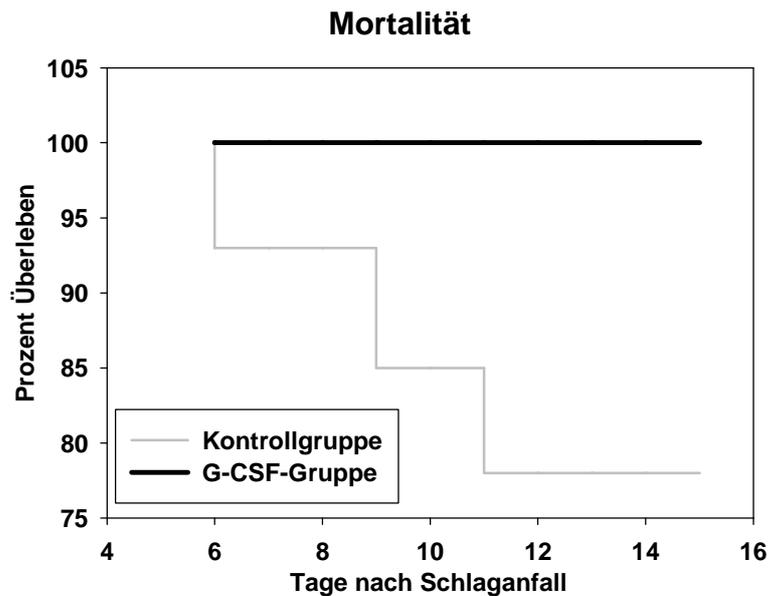
Wie nach einem schweren operativen Eingriff bei alten Ratten üblich (Modo et al. 2000), verloren sowohl die Tiere der Kontroll- als auch der G-CSF-Gruppe innerhalb der ersten postoperativen Woche an Gewicht. Ein prozentualer Unterschied im Gewichtsverlauf ließ sich nicht feststellen (siehe Graph 1).



Graph 1 - Im Gewichtsverlauf wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen G-CSF- und Kontrollgruppe festgestellt

4.1.2 Mortalitätsrate

Einer der bemerkenswerten Effekte der G-CSF-Behandlung war eine signifikante Senkung der Mortalitätsrate zwischen Tag 7 und 15 ($p=0,007$, Mantel-Cox-Test). Drei Tiere der Kontrollgruppe starben an den Tagen 7, 10 und 12, hingegen überlebten alle G-CSF-behandelten Tiere (Graph 2).



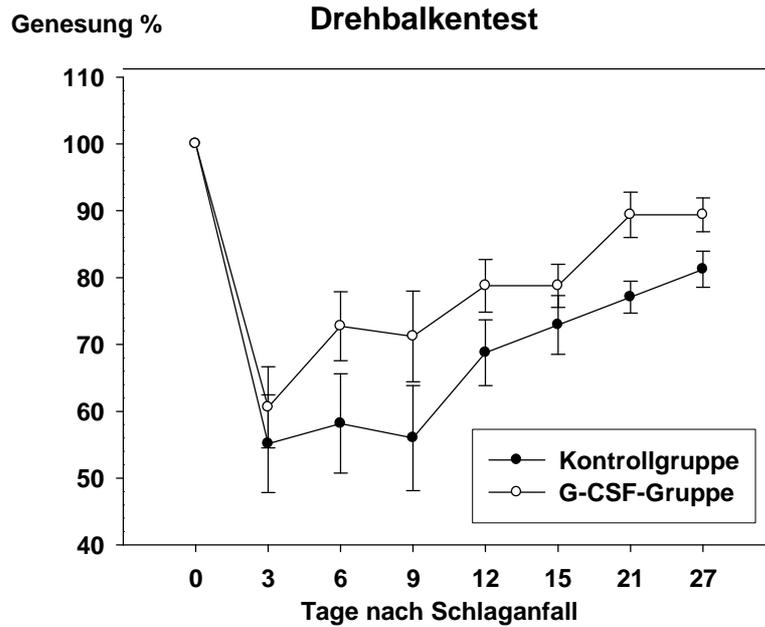
Graph 2 - Eine signifikante Senkung der Mortalität durch G-CSF-Behandlung zeigte sich im Mantel-Cox-Test, hier dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve

4.2 Verhaltenstests

Während der ersten drei Tage nach dem operativen Eingriff hatten alle Ratten eine deutlich verminderte Leistungsfähigkeit, was zumindest teilweise der chirurgischen Prozedur an sich zugeschrieben werden konnte.

4.2.1 Drehbalkentest (Rotating Pole)

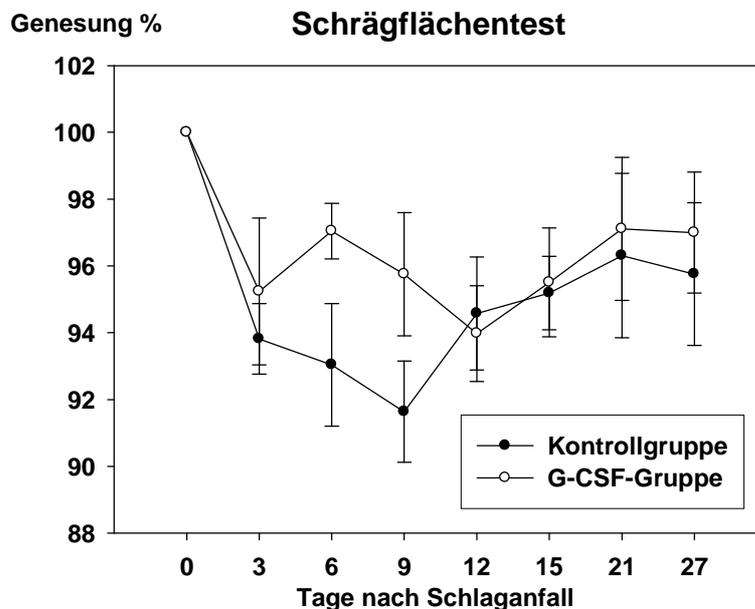
Nach einem abrupten Abfall der Leistungsfähigkeit aller Tiere auf dem Drehbalken am dritten postoperativen Tag begannen die G-CSF-behandelten Ratten sich zu verbessern und erholten sich bis auf 90% an Tag 28 (Graph 3, weiße Kreise). Die Kontrollratten verbesserten sich mit einer vergleichweisen Verzögerung von neun Tagen und erreichten am 28. Tag einen Wert von 78% der Grundleistung (Graph 3, schwarze Kreise). Vor allem aufgrund der zeitlich früheren Besserung konnte ein signifikanter, nutzbringender Effekt der G-CSF-Behandlung auf die Erholung der bilateralen sensomotorischen Koordination zwischen den Tagen 6 und 28 festgehalten werden ($p < 0,05$).



Graph. 3 – Die G-CSF-Behandlung hatte einen positiven Effekt auf die Erholung der motorischen Defizite.

4.2.2 Schrägflächentest (Inclined Plane)

Auf der Schrägfläche war der nutzbringende Effekt der G-CSF-Behandlung vom sechsten bis neunten Tag nach dem Eingriff signifikant sichtbar ($p < 0,05$).

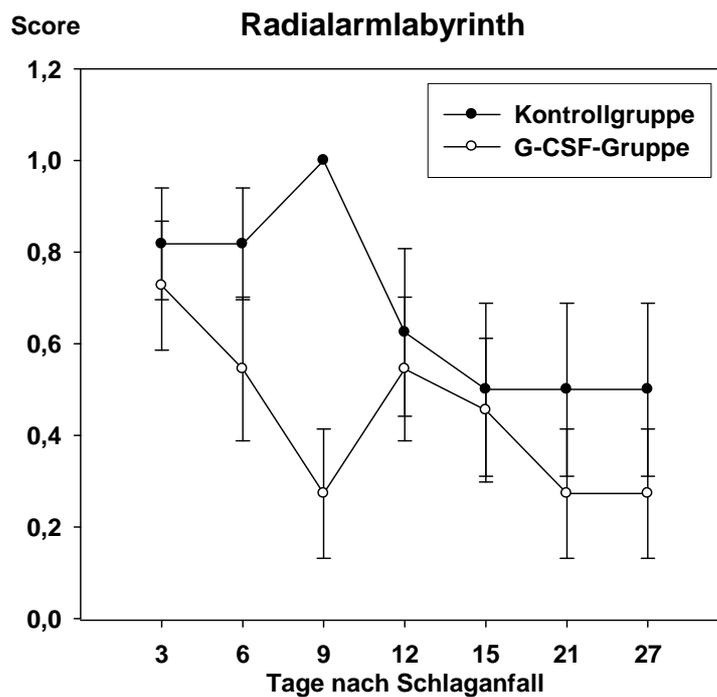


Graph 4 - Die G-CSF-Behandlung hatte einen temporär begrenzten positiven Effekt auf die Fähigkeit das Gleichgewicht auf einer schrägen Fläche zu halten ($p < 0,05$, weiße Kreise)

Hier begannen sich die Kontrolltiere erst ab dem neunten postoperativen Tag zu erholen (Graph 4, schwarze Kreise) und erreichten am zwölften Tag das Level der G-CSF-Tiere (Graph 4, weiße Kreise). Danach stabilisierten sich beide Gruppen mit gleicher Geschwindigkeit bis zu einer Leistungsfähigkeit von 96% des präoperativen Status am 28. postoperativen Tag.

4.2.3 Radialarmlabyrinthtest (Radial-Arm Maze)

Die Leistung der Kontrolltiere verschlechterte sich progressiv während der ersten neun Tage nach der OP. Obwohl die Kontrolltiere sich zu einem gewissen Maß zwischen Tag 9 und 15 erholten, blieb die Anzahl der Fehler in diesem Test hoch (Graph 5, schwarze Kreise). Die Behandlung mit G-CSF reduzierte signifikant die Fehleranzahl zwischen dem 6. und 12. Tag der Behandlung (Graph 5, weiße Kreise, $p < 0,05$). Danach bewegten sich beide Gruppen jedoch auf einem vergleichbaren Level und mit einer erheblichen Fehlerrate.



Graph 5 – Die G-CSF-Behandlung verbesserte das Arbeitsgedächtnis signifikant zwischen Tag 6 und 12 ($p < 0,05$).

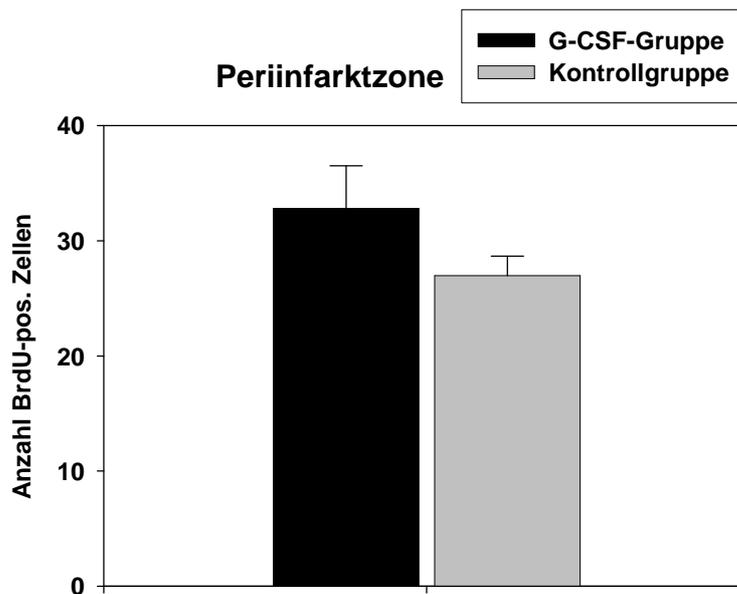
4.3 Immunhistochemische Analysen

4.3.1 Infarktgröße

Durch statistische Analysen zeigte sich nach der G-CSF-Behandlung keine signifikante Reduktion der Infarktgröße ($p > 0,05$). Bei der G-CSF-behandelten Gruppe betrug das Infarktvolumen durchschnittlich $264 \pm 62 \text{ mm}^3$, bei der Placebo-behandelten Gruppe $215 \pm 36 \text{ mm}^3$.

4.3.2 Periinfarktzone

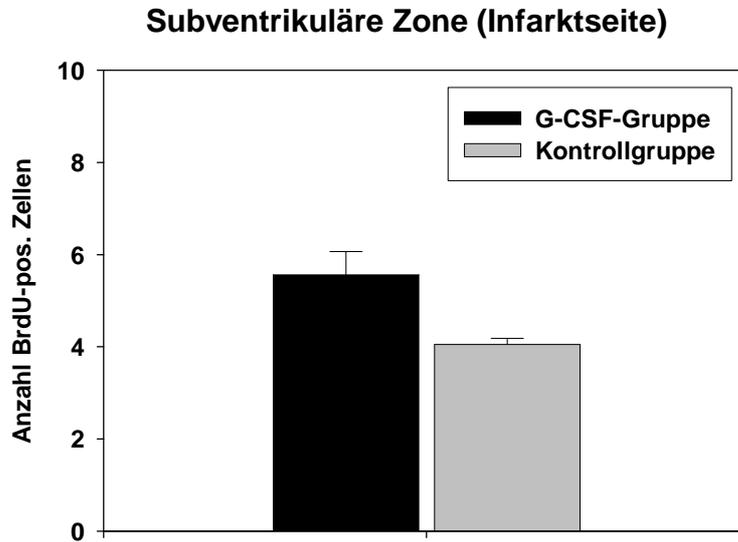
Um zu ermitteln ob eine G-CSF-Behandlung zu einer vermehrten Anzahl neugeborener Zellen im Periinfarktareal führt, zählten wir zuallererst BrdU-positive Zellen. Im Vergleich mit den Placebo-behandelten Tieren zeigten die Mittelwerte neugeborener Zellen pro Schnitt bei den G-CSF-behandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede (Graph 6, $p > 0,05$).



Graph 6 - Der Mittelwert der Anzahl gezählter BrdU-positiver Zellen pro Kontrolltier (grau) und G-CSF-Tier (schwarz) in der Periinfarktzone erbrachte keinen signifikanten Unterschied.

4.3.3 Subventrikuläre Zone (SVZ)

In der Subventrikulären Zone, welche eine wichtige Rolle bei der Neurogenese spielt (siehe Kap. 2.8), zeigten die stereologischen Analysen der Infarkthemisphäre einen signifikanten Anstieg BrdU-positiver Zellen bei G-CSF-behandelten Tieren (Graph 7, $p=0,03$).

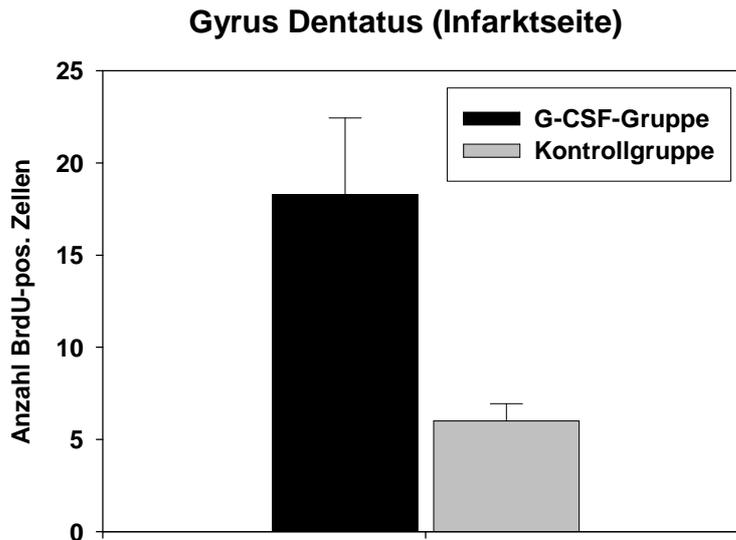


Graph 7 - Die Auswertung der SVZ der infarzierten Hemisphäre zeigte signifikant mehr BrdU-positive Zellen bei der G-CSF-behandelten Gruppe ($p=0,03$).

Bei der Auszählung der nicht-infarzierten Hemisphäre wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen ermittelt.

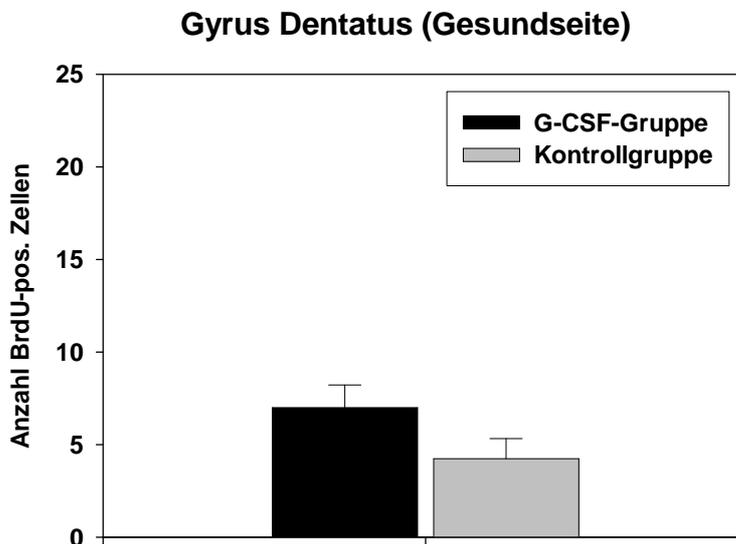
4.3.4 Gyrus Dentatus

Die Analyse des Gyrus Dentatus offenbarte einen weiteren signifikanten Anstieg BrdU-positiver Zellen ($p=0,021$) in der Infarkthemisphäre G-CSF-behandelter Tiere im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren (Graph 8).



Graph 8 – Der Mittelwert der absolut gezählten BrdU-positiven Zellen innerhalb des Gyrus Dentatus von Placebo-behandelten Tieren (Grau) und G-CSF-behandelten Tieren (Schwarz) auf der Infarkthemisphäre zeigte einen signifikanten Unterschied ($p=0,021$).

Dieser Unterschied war allerdings auf der nicht-ischämischen Seite nicht signifikant (Graph 9, $p=0,203$).



Graph 9 – Der Mittelwert der absolut gezählten BrdU-positiven Zellen innerhalb des Gyrus Dentatus von Placebo-behandelten Tieren (Grau) und G-CSF-behandelten Tieren (Schwarz) auf der nicht-infarzierten Hemisphäre zeigte keinen signifikanten Unterschied.

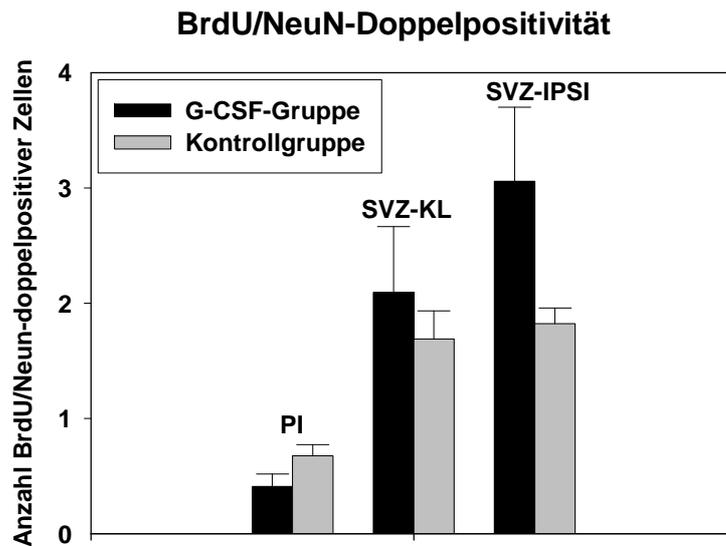
4.3.5 BrdU-NeuN-Doppelpositivität

Um den Ursprung dieser neugeborenen Zellen zu erforschen analysierten wir 20 zufällig ausgewählte BrdU-positive Zellen pro Tier und Region auf gleichzeitige NeuN-Markierung, welche neuronenspezifisch ist (siehe Abbildung 9).



Abb. 9 - Identifizierung neugeborener Neurone mittels Immunfluoreszenz: Rote Fluoreszenz signalisiert BrdU-Positivität und somit neugeborene Zellen (links); Grüne Fluoreszenz markiert NeuN-Positivität, also Neurone (Mitte). Gleichzeitige Markierung mit beiden Antikörpern zeigen ausschließlich neugeborene Neurone (rechts)

Der Prozentsatz dieser doppelt markierten Zellen wurde mit der Gesamtanzahl der gezählten BrdU-positiven Zellen dieser Regionen multipliziert, wodurch wir eine hochgerechnete Aussage über die Anzahl doppelpositiver Zellen machen konnten. Da die Menge doppelpositiver Zellen sich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe nicht signifikant unterschied, schlussfolgerten wir, dass G-CSF keinen neuronenspezifischen Wachstumseffekt im Periinfarktareal (PI) und der SVZ der nicht-infarzierten Seite (SVZ-KL) besaß. Nichtsdestotrotz zeigte sich die Anzahl neugeborener Zellen, welche sich zu fertigen Neuronen differenzierten, in der SVZ der infarzierten Hemisphäre (SVZ-IPSI) G-CSF-behandelter Tiere signifikant höher (Graph 10, $p=0,01$).



Graph 10 – Signifikante Unterschiede in der Anzahl doppelpositiver ($\text{NeuN}^+/\text{BrdU}^+$) Zellen zwischen G-CSF-behandelten (schwarz) und Placebo-behandelten (grau) Tieren zeigten sich in der SVZ der Infarkthemisphäre (SVZ-IPSI), aber nicht in der SVZ der kontralateralen Hemisphäre (SVZ-KL) und dem Periinfarktareal (PI).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

Die Behandlung mit G-CSF führte bei den alten Ratten zu einer deutlichen Senkung der Mortalität zwischen Tag 7 und 15.

Das Infarktvolume veränderte sich durch die G-CSF-Behandlung nicht signifikant.

Im Durchschnitt führte die G-CSF-Behandlung bei den Tieren zu einer signifikant verbesserten motorischen Funktion während eines definierten Zeitfensters. Die Tiere erholten sich im Drehbalkentest früher und erreichten ein höheres Endleistungslevel als die Kontrolltiere. Ein signifikanter Effekt auf die Erholung der bilateralen sensomotorischen Koordination bestand von Tag 6 bis 28 nach Schlaganfall. Im Schrägflächentest zeigte sich zudem ein, wenn auch temporär begrenzter, positiver Effekt der G-CSF-Gabe von Tag 6 bis 9. Das Arbeitsgedächtnis der Tiere zeigte sich nach G-CSF-Behandlung temporär verbessert. Im Radialarmtest schnitten die G-CSF-behandelten Tiere signifikant besser ab, allerdings limitiert auf Tage 6 bis 12 der Behandlung.

Histologisch zeigten die G-CSF-behandelten Tiere im Perinfarktareal keine signifikant höheren Zahlen BrdU-positiver Zellen. In der Subventrikulären Zone konnte insgesamt eine signifikant größere Menge BrdU-positiver Zellen bei den G-CSF-behandelten Tieren aufgefunden werden. Dieser Behandlungseffekt zeigte sich auf der Infarktseite noch deutlicher (Beispiel Abbildung 10).

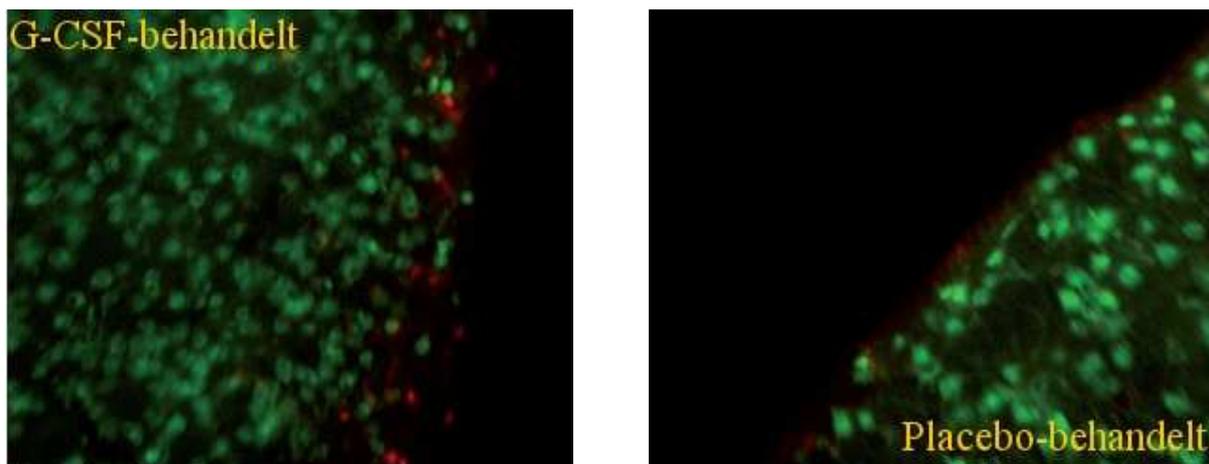


Abb. 10 – Beispielhafte Darstellung der Doppelfluoreszenz einer Region der Subventrikulären Zone einer G-CSF-behandelten Ratte (links) und der Subventrikulären Zone einer Placebo-behandelten Ratte (rechts). Zu Beachten sind deutlich mehr rot fluoreszierende BrdU-positive Zellen in der SVZ des G-CSF-behandelten Tieres.

Auch im Gyrus Dentatus präsentierte sich ein signifikanter Anstieg BrdU-positiver Zellen in der Infarkthemisphäre in der Gruppe der mit G-CSF behandelten Tiere, jedoch nicht in der nicht-ischämischen Hemisphäre.

Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl von Zellen, welche gleichzeitig mit BrdU und NeuN angefärbt waren und somit neugeborene Neurone darstellten, zeigte sich ausschließlich in der Subventrikulären Zone der Infarkthemisphäre.

5.2 Diskussion der Methodik

5.2.1 Permanente Transkranielle Okklusion der A. cerebri media (Permanent Transcranial Middle Cerebral Artery Occlusion; pMCAO)

Die permanente transkranielle Okklusion der A. cerebri media mittels Elektrokoagulation bietet eine in Studien häufig genutzte Möglichkeit zur reproduzierbaren Auslösung eines fokalen Schlaganfalls. Generell empfehlen die STAIR-Kriterien (STAIR 1999) sowohl bei kleinen als auch großen Tieren zuerst eine permanente MCAO zu untersuchen, bevor Reperusionsmodelle (transiente MCAO) getestet werden. In klinischen Studien wurde zudem gezeigt, dass die Reperusionsrate nach einem Schlaganfall mit 20% gering ist (Hacke et al. 2005a) und somit die permanente Okklusion der Realität näher kommt.

Ein so durchgeführtes Tiermodell führt zu einem reproduzierbaren, klar definierten Infarkt im dorsolateralen zerebralen Kortex und dem darunter liegenden Striatum. Die geschädigten Areale sind normalerweise für die sensomotorische Kontrolle der kontralateralen Vorder- und Hinterbeinfunktion zuständig (STAIR 1999) und können somit durch die von uns ausgewählten Verhaltenstests direkt untersucht werden.

Es gibt verschiedene experimentelle Schlaganfallmodelle um reproduzierbar fokale cerebrale Ischämien hervorzurufen. Populär ist das sogenannte Fadenmodell, bei dem ein häufig beschichteter Nylonfaden intraluminal über die A. carotis interna bis zur A. cerebri media vorgeschoben wird und diese somit okkludiert. Ein Vorteil dieser Technik besteht darin, dass zum einen keine Kraniotomie nötig ist, zum anderen aber vor allem die Möglichkeit zur späteren Wiedereröffnung des Blutkreislaufes durch Zurückziehen des Fadens besteht. In einer Studie von Wang et al. ließ sich mit dem Fadenmodell bei alten Ratten jedoch kein Infarkt des Versorgungsgebiets der A. cerebri media produzieren (Wang et al. 1995). Zudem zeigten Aspey et al. in einem Vergleich verschiedener Rattengattungen, dass die in unserer

Studie verwendete Sprague-Dawley-Gattung beim Fadenmodell vergleichsweise kleine, und in ihrer Lokalisation sehr variable Infarktareale aufwies (Aspey et al. 2000).

Eine weitere Möglichkeit in dieser Hinsicht stellen photothrombotisch induzierte Läsionen dar. Hierbei wird ein stark photosensitiver Farbstoff (z.B. Bengal Rosa) systemisch injiziert und eine spezifische Region der Kalotte belichtet. Von Nachteil ist, dass die dadurch entstandenen ischämischen Regionen nur eine kleine Penumbrazone besitzen und die Methode allgemein nicht physiologisch erscheint (Bacigaluppi et al. 2010).

Eine experimentelle cerebrale Ischämie kann auch durch thrombembolische Modelle ausgelöst werden. Hierbei werden kleine (<50 µm Durchmesser) Mikro- oder große (300-400µm Durchmesser) Makrosphären in die A. carotis interna gespritzt, welche dann thrombembolisch Gefäße okkludieren. Wenn auch der physiologischen Schlaganfallpathogenese sehr nahe kommend, hat sich diese Methode aufgrund der hohen Variabilität der produzierten Infarktareale bisher trotzdem nicht durchsetzen können (Bacigaluppi et al. 2010).

Wir entschieden uns letztendlich bezüglich unserer Studie für die transkranielle Okklusion mittels Elektrokoagulation, weil sie uns die sicherste Methode für einen reproduzierbaren, gut abgrenzbaren und der Pathophysiologie des menschlichen Schlaganfalls am nächsten kommenden Infarkt bot und wir zudem keiner Reperfusionsmöglichkeit bedurften.

5.2.2 G-CSF-Behandlung

Um mögliche Auswirkungen der täglichen Injektionsprozedur auf das Behandlungsergebnis zu vermeiden, wurde auch den Tieren der Kontrollgruppe täglich eine intraperitoneale Injektion (Kochsalzlösung) gegeben.

Die G-CSF-Gabe wurde erst eine Stunde nach dem Wiedereröffnen des Blutkreislaufes, also insgesamt etwa 2,5 h nach Beginn der Okklusion, begonnen um somit die klinische Akuttherapie zu simulieren.

Wir wählten mit 15 µg/kg Körpergewicht eine niedrige Dosis G-CSF, um einen Vergleich zu vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe mit ähnlichem Dosierungsschema zu ermöglichen (Schneider et al. 2006). Zudem war schon zu Beginn unserer Studie gezeigt, dass G-CSF in niedriger Dosierung auch klinisch bei Schlaganfallpatienten sicher erscheint (Sprigg et al. 2006).

5.2.3 Infarktgrößenauswertung

Hierzu wurde jeder 20. Gehirnschnitt mit dem Antikörper NeuN angefärbt, welcher ausschließlich ausgereifte, funktionsfähige Neurone markiert. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass mithilfe von NeuN das Infarktgewebe deutlich identifiziert werden kann (Badan et al. 2003). Durch volumetrische Auswertungen ließ sich die jeweilige Infarktgröße für jedes Tier ungefähr berechnen.

In Fachkreisen besteht hingegen noch keine absolute Einigkeit über die Aussagekraft der Infarktgröße bezüglich eines letztendlichen Benefits für das Outcome. Während die einen argumentieren, dass die Infarktgröße gut mit neurologischen Defiziten korreliert (Rogers et al. 1997), scheint dies dennoch nicht grundsätzlich der Fall zu sein (Hattori et al. 2000, Reglodi et al. 2003). Für eine bestmögliche Abschätzung des positiven Nutzens einer Therapie nach einem Schlaganfall sind funktionelle Verhaltenstests von größerer Bedeutung (Gibson et al. 2005a).

5.2.4 Verhaltenstests

Als Verhaltenstests wurden ausschließlich von uns in vorherigen Studien erprobte Versionen gewählt, damit die Untersucher Erfahrung in den Testungen hatten. Hierbei wurde darauf geachtet, dass verschiedene kognitive Leistungen getestet wurden. In diesem Zusammenhang lag der Schwerpunkt auf Funktionen, welche durch eine Okklusion der A. cerebri media typischerweise gestört sind:

Der Drehsäulentest beurteilt feine sensomotorische Funktionen im MCAO-Modell (Goldstein 1993).

Der Schrägflächentest wurde nach den Erkenntnissen von Rivlin und Tator (Rivlin und Tator 1977) durchgeführt, um die Balancefähigkeit im Stand weitergehend zu analysieren.

Visuelle mnestische Bereiche, welche im Rahmen einer MCAO bei Parietallappenbeteiligung beeinträchtigt werden, wurden anhand des Radialarmabyrinths nach Olton und Papas erfasst (Olton und Papas 1979).

5.2.5 BrdU- und NeuN-Auswertung

Die immunhistochemische Färbung mit BrdU stellt die am weitesten verbreitete Möglichkeit zur Darstellung und Identifizierung neugeborener Zellen dar (del Rio und Soriano 1989). Hierbei baut sich während der Synthesephase des Zellzyklus das BrdU-Molekül statt der Base Thymidin in die DNS ein. In diesem Zusammenhang ist wichtig, dass BrdU sich zwar bei der Teilung von Zellen anreichert, nicht jedoch beim Reparaturvorgang bereits adulter Zellen

(Cooper-Kuhn und Kuhn 2002). Gleichzeitig färbt man mit BrdU alle Arten neugeborener Zellen, das heißt neben Neuronen auch Entzündungszellen, Gliazellen, Astrozyten und andere. Eine alleinige BrdU-Färbung erlaubt somit nur eine allgemeine Aussage über die Proliferationsmenge des betreffenden Gewebes, aber kein Urteil über die Teilungsrate einzelner Zellarten. Als geeignete Zusatzuntersuchung hat sich die immunhistochemische Doppelfärbung mit dem neuronalen Marker NeuN bewährt (Mullen et al. 1992). Zu Beachten ist, dass NeuN ausschließlich lebensfähige, ausdifferenzierte Neurone färbt. Sämtliche undifferenzierten neuronalen Vorstufen, von welchen im Laufe der Entwicklung zudem ein erheblicher Prozentsatz stirbt (Biebl et al. 2000), werden also nicht markiert. Neurone bilden erst nach etwa 10 Tagen NeuN (Cooper-Kuhn und Kuhn 2002). Somit sollte, wie in unserer Studie geschehen, mindestens dieser Zeitraum nach der letzten BrdU-Gabe abgewartet werden, bis die Tiere perfundiert werden.

Um einen größtmöglichen Kontrast der Fluoreszenzfärbungen zwischen Zielzellen und umliegendem Gewebe zu erreichen, wurde in mehreren Probefärbungen für beide Antikörper die optimale Antikörpertitrierung ermittelt: Für BrdU war dies 1:250, für NeuN 1:500. Zusätzlich liegt der Vorteil der in der Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper im Vergleich zu polyklonalen Antikörper in ihrer höheren Spezifität und somit niedrigeren Hintergrundfärbung (Pasternak 1997). Durch die Wahl der Fluoreszenzmarkierung mit den Farben rot, grün und blau, welche sich an unterschiedlichen Enden des Lichtspektrums befinden, konnten wir einer Überschneidung der Emissionsspektren vorbeugen.

Die einzelnen Schnitte wurden dann wenige Tage nach der Färbung untersucht, damit die Ausbleichung der Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper möglichst gering und bei jedem Schnitt etwa gleich blieb.

Bei der späteren Auswertung wurde darauf geachtet, bei jedem Tier nur Gehirnschnitte zwischen den angegebenen Schnitthöhen Bregma 1 mm bis -0,4 mm bei SVZ und Perinfarktareal, bzw. Bregma 2,6 bis -3,4 beim Gyrus Dentatus, auszuzählen.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

Das letztendliche Ziel der Schlaganfallbehandlung stellt die vollständige Wiederherstellung der neurologischen Ausgangsfunktion dar. Jüngste Forschungsprojekte konzentrierten sich somit nicht nur auf den Schutz von Gehirngewebe sondern vielmehr gleichzeitig auf die Entdeckung von Mechanismen pharmakologischer Schlaganfalltherapeutika, welche die Genesung beschleunigen.

In diese Richtung steuert auch die Erforschung von G-CSF als einem multimodal in das Schlaganfallgeschehen eingreifenden Faktor. Andere näher analysierte Wirkstoffe in diesem Bereich stellen zum Beispiel das hauptsächlich in der Niere synthetisierte Hormon Erythropoetin (Brines und Cerami 2005) oder das Geschlechtshormon Östrogen dar (Suzuki et al. 2009, Dubal et al. 1998).

In den letzten Jahren wurde G-CSF bereits erfolgreich eingesetzt um bei diversen Arten experimenteller zerebraler Ischämien die neurologische Funktion zu verbessern, z.B. nach transienter Ischämie bei der Maus (Komine-Kobayashi et al. 2006, Gibson et al. 2005a, Six et al. 2003, Yanqing et al. 2006) und der Ratte (Shyu et al. 2004, Schneider et al. 2005, Schäbitz et al. 2003), als auch nach permanenter Ischämie beider Tierarten (Kawada et al. 2006, Schneider et al. 2006). Zusätzlich ließen sich in diesen Studien die Verbesserungen der neurologischen Funktion sowohl kurz- als auch langfristig feststellen.

Ein einschränkender Faktor der vorherigen Studien lag jedoch darin, dass sie alle bei jungen Tieren durchgeführt wurden. Da das Infarktgeschehen bei jungen und alten Individuen unterschiedliche Verläufe zeigt (Popa-Wagner et al. 1998), lassen sich diese bisherigen Ergebnisse nicht automatisch auf die statistisch weitaus häufiger betroffenen alten Individuen übertragen.

5.3.1 Funktionelles Outcome

Zum ersten Mal konnte mit unserer Studie eine deutliche Erholung der Lauffunktion (Drehbalkentest) von alten Tieren über die gesamte Testperiode von 28 Tagen gezeigt werden. Die Erholung koordinativ-motorischer (Schrägflächentest) und kognitiver Funktionen (Radialarmabyrinth) zeigte nur einen zeitlich begrenzten signifikant nutzbringenden Effekt der G-CSF-Behandlung, eingeschränkt auf die ersten zwölf Tage nach der cerebralen Ischämie. Dass die signifikanten Verbesserungen der funktionellen Erholung der alten Tiere in unserer Studie fast ausschließlich während dieser Behandlungsphase mit G-CSF auftraten, steht im Gegensatz zu Studien an jungen Tieren, bei denen die sämtliche Effekte auch über die Behandlungsphase hinaus zu erkennen waren (Gibson et al. 2005a).

Wir schließen aus den Ergebnissen, dass zumindest bei alten Tieren längere und intensivere Behandlungsperioden mit G-CSF nötig sein könnten um die nutzbringende Wirkung zu maximieren.

5.3.2 Mortalität

Neben dieser Verbesserung der motorischen und kognitiven Funktion zeigte G-CSF deutlich positive Langzeiteffekte auf die Mortalität: Alle 15 Tiere der G-CSF-Gruppe überlebten die gesamte Testperiode, von den 14 Tieren der Placebogruppe starben jedoch drei. Die vorher zusammengefassten Ergebnisse untermauern Befunde vorangegangener Studien junger Nagetiere, in denen eine einzelne intravenöse G-CSF-Gabe die Mortalität nach MCAO senkte (Gibson et al. 2005a, Six et al. 2003). Generell darf diese überlebensverbessernde Eigenschaft von G-CSF bei alten Individuen als starker Behandlungseffekt interpretiert werden, da es wohlbekannt ist, dass alte Ratten eine vermehrte Anfälligkeit und höhere Mortalitätsraten nach einem Schlaganfall haben (Badan et al. 2003, Zhang et al. 2005).

5.3.3 Infarktgröße

Verschiedene bisherige Studien berichten, dass die Gabe von G-CSF die endgültige Infarktgröße nach einem Schlaganfall signifikant reduziert habe (Gibson et al. 2005a, Six et al. 2003, Schäbitz et al. 2003). Ein solcher Effekt konnte in unserer Studie bei alten Ratten nicht gezeigt werden. Dies könnte an einer zu niedrigen Dosis in unserer Studie liegen, schließlich wurde in oben genannten Studien Dosierungen von 50 bis ≥ 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht statt den in unserer Arbeit verwendeten 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht verwendet. Für den Infarkt reduzierenden Effekt wurde aber in Meta-Analysen gezeigt, dass er dosisabhängig ist und höhere Dosierungen mit einem stärkeren neuroprotektiven Effekt einhergehen: Eine Dosiserhöhung um 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht reduzierte bei totalen Dosierungen zwischen 10 und 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht die Infarktgröße um 0,84%, wenn die G-CSF-Behandlung innerhalb der ersten sechs Stunden nach Schlaganfall begonnen wurde und 2,06% wenn die Behandlung mehr als sechs Stunden später begonnen wurde (Minnerup et al. 2008, England et al. 2009).

Hinzu kommt, dass bei einer Nekropsie der verstorbenen drei Ratten der Placebogruppe besonders große Infarkte entdeckt wurden. In unsere Auswertungen der Infarktgröße gingen jedoch nur die Gehirne überlebender Ratten mit ein, was das vorhandene Ergebnis erklären könnte.

Des Weiteren bedingt eine verkleinerte Infarktgröße auch nicht automatisch ein verbessertes Outcome. Dies wird an einer bildgebenden Studie von Weber et al. deutlich, welche nach einem Schlaganfall die magnetresonanztomografisch erfasste Infarktgröße mit der letztendlichen neurologischen Funktion verglich. Eine Korrelation der beiden Endwerte konnte dabei nicht demonstriert werden (Weber et al. 2008).

5.3.4 Bedeutung des Faktors „Alter“

Bisherige Daten zeigten, dass die neurologischen Funktionen bei alten Ratten durch Ischämien stärker geschädigt werden als bei jungen Tieren und zudem die Wiedergewinnung dieser Funktionen begrenzt ist. Darüber hinaus weisen alte Tiere im Vergleich zu jungen eine beschleunigte Infarktentwicklung in der ersten Woche nach einem Schlaganfall auf (Popa-Wagner et al. 2007). Es wurde mehrfach gezeigt, dass die letztendlichen Infarktgrößen alter Ratten deutlich über denen junger Ratten liegen (DiNapoli et al. 2008). Die unterschiedlichen Voraussetzungen im Schlaganfallgeschehen zwischen den Altersgruppen haben auch bedeutenden Einfluss auf neurologische Therapieformen. Beispielsweise wurde jüngst in einer Studie gezeigt, dass die gleichzeitige Gabe von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ-1-Peptid (=plasminogen-activator-inhibitor-type-1-derived peptide, EEIIMD) mit rekombinantem Gewebsplasminogen-Aktivator (rt-PA), einem Wirkstoff welcher aktuell zur Thrombolyse auf Stroke Units benutzt wird, bei alten Ratten im Gegensatz zu jungen Ratten keine Verbesserung hinsichtlich des absoluten Infarktvolumens, der Ödementstehung oder des funktionellen Outcomes erbrachte (Tan et al. 2009).

All diese Faktoren zusammen verkomplizieren sicherlich jeden Therapieansatz bei alten Individuen.

5.4 Diskussion der zu Grunde liegenden Mechanismen

Es kann aufgrund der vorliegenden Daten davon ausgegangen werden, dass G-CSF einen einzigartigen multimodalen Wirkmechanismus besitzt.

Die Verbesserung der neurologischen Funktion während der Behandlungsphase könnte ein Anzeichen für einen direkten Effekt von G-CSF auf die motorische und kognitive Funktion sein, also unabhängig von einem Schlaganfall. Dies wäre übereinstimmend mit neuesten Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, in welchen bei einer Gegenüberstellung von Wildtyp- und G-CSF-Knockout-Mäusen, also Mäusen, welchen mittels Gentechnik das Gen für G-CSF deaktiviert wurde, G-CSF als essentieller Faktor für die normale Entwicklung der Lauffunktionen etabliert wurde (Diederich et al. 2009). Mögliche Mechanismen lägen hierbei sowohl in einer relativen Steigerung des Aktivitätslevels, beispielsweise durch Hochregulierung von exzitatorischen Glutamat-Rezeptoren oder Herunterregulierung inhibitorischer GABA-Rezeptoren.

Genauso kann G-CSF auch durch andere Wirkmechanismen bei einem vorliegenden Schlaganfall eingreifen und die entstandenen Schäden einer Ischämie minimieren und teilweise auch reparieren:

a) Anti-Apoptose

Ein aus therapeutischer Sicht vorrangiges Problem bezüglich der Neurogenese neuronaler Stammzellen des adulten Gehirns resultiert aus der Tatsache, dass viele der neu gebildeten Neurone sterben (Darsalia et al. 2005). Hinsichtlich dessen könnten die aus unserer Studie vorliegenden Ergebnisse dafür sprechen, dass der zu Grunde liegende Mechanismus der Funktionsverbesserung nach einem Schlaganfall durch G-CSF durch Inhibition der Apoptose (Solaroglu et al. 2009) bewirkt wird. Tiefergehende Analysen ergaben, dass dieser Effekt über die Induktion mindestens drei verschiedener Regelkreise zustande kommt: des STAT-3-Signalwegs (Signal Transducers and Activators of Transcription), des ERK-Signalwegs (Extrazelluläre Signal-Regulierte Kinase) und des PI3K-Akt-Signalwegs (Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt) (Schneider et al. 2005).

b) Angiogenese

Ein weiterer Grund für das bessere Outcome könnte die in diversen G-CSF-Studien gezeigte vermehrte Angiogenese sein (Lee et al. 2005, Toth et al. 2008, Thored et al. 2007). Zum einen wird angenommen, dass G-CSF durch direkte Aktivierung der Endothelialzellen und Förderung ihrer Proliferation und Migration wirkt (Bussolino 1991). Zum anderen spielt die Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark eine wichtige Rolle. G-CSF mobilisiert aus dem Knochenmark CD34⁺-Stammzellen, welche auch endotheliale Vorläuferzellen beinhalten, in die Peripherie. Diese aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Vorläuferzellen haben dann großen Anteil an der Gefäßneubildung des Gehirns nach cerebralen Ischämien (Lee et al. 2005, Toth et al. 2008).

c) Verminderung der Exzitotoxizität

Hinzu kommt, dass G-CSF die Fähigkeit zugesprochen wird, nach ischämischen Schlaganfällen die schädigende Exzitotoxizität zu vermindern indem es die schädlich überhöhte Glutamatfreisetzung in der hyperakuten Phase des Schlaganfalls verhindert und somit neuroprotektive Eigenschaften zeigt. Ein solcher Effekt wurde sowohl in vitro (Schäbitz et al. 2003) als auch in vivo (Han et al. 2008) nachgewiesen. Es wird davon ausgegangen, dass G-CSF diese Wirkung hauptsächlich über seinen spezifischen Rezeptor G-CSFR

vermittelt. Han et al. schlagen vor, dass G-CSF aufgrund seiner funktionellen Verwandtschaft mit Erythropoietin auf ähnliche Weise wirken könnte. Erythropoietin wirkt entweder über eine Verminderung der Exozytose von synaptischen Vesikeln oder über eine Reduktion der Kalzium-induzierten Glutamatausschüttung, wahrscheinlich über die Aktivierung der Tyrosinkinase JAK2 (Kawakami et al. 2001).

d) Immunmodulation

Zusätzlich besitzt G-CSF intrinsische immunmodulatorische Wirkungen. Da ZNS-Verletzungen das sensible Gleichgewicht zwischen Immunsystem und ZNS stören und somit Infektionen begünstigen (Meisel et al. 2005), könnte die schon bei anderen Krankheitsbildern (Squadrito et al. 1997) untersuchte immunmodulatorische Wirkung von G-CSF auch in unserer Studie ein Grund für die gesunkene Mortalität sein. Da die Entzündungsreaktion eine Hauptursache für den Zelltod nach zerebraler Ischämie darstellt (Leker und Shohami 2002), wird unter anderem angenommen, dass lokale anti-inflammatorische Effekte von G-CSF einen Teil der vermittelten Neuroprotektivität erklären könnten (Komine-Kobayashi et al. 2006). Hierbei könnte besonders die in Studien belegte Inhibition der induzierbaren NO-Synthetase wie auch die Reduktion von TNF- α , TGF- β und anderer proinflammatorischer Zytokine eine große Rolle spielen.

Der endgültige Einfluss der Entzündungsreaktion auf das Schlaganfallgeschehen ist letztlich noch nicht im Detail erklärt. Beispielsweise wird vermutet, dass eine erhöhte Anzahl von Leukozyten durch vermehrte Bindung an Endothelialzellen und somit weiterem Verschluss von Blutgefäßen den neuronalen Schaden noch vergrößern kann (del Zoppo 1994). Auf der anderen Seite zeigt sich jedoch, dass eine verminderte Anzahl von Leukozyten sich auch negativ auf das funktionelle Outcome auswirken kann (Gibson et al. 2005b).

Insgesamt herrscht die Meinung vor, dass G-CSF die Fähigkeit besitzt in dieses komplexe Zusammenspiel modulatorisch einzugreifen, das heißt proinflammatorische Faktoren inhibitorisch zu beeinflussen und umgekehrt (Sevimli et al. 2009).

e) Mobilisation von Stammzellen

Nach G-CSF-Gabe steigt die Anzahl aus dem Knochenmark stammender zirkulierender Stammzellen (Orlic et al. 2001), welche dann teilweise in die geschädigten Areale einwandern (Corti et al. 2002). Wenn auch noch nicht endgültig erforscht, so wird doch angenommen, dass diese hämatopoetischen Stammzellen in einer Interaktion mit dem ischämischen Gewebe trophische Faktoren wie GDNF (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor) und BDNF

(Brain-Derived Neurotrophic Factor) bilden oder andere Zellen zu deren Produktion anregen (Shyu et al. 2004), was zu einer besseren Erholung nach zerebralen Ischämien beitragen könnte.

f) Neurogenese

Die Neurogenese spielt eine wichtige Rolle für das Langzeitergebnis eines Schlaganfalls. Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen der Neurogenese haben in den letzten Jahren beträchtlich zugenommen. Sie scheinen hoch-komplex und mehrschichtig zu sein.

Schon früh wurde gezeigt, dass die Neurogeneserate physiologisch im Laufe des Lebens abnimmt (Kuhn et al. 1996). Genauso zeigen Erkrankungen wie Depressionen einen deutlich negativen Effekt auf die Neubildung ausdifferenzierter Neurone. Auch psychischer Stress im Allgemeinen (Lemaire et al. 2000, Tanapat et al. 2001) und die unter anderem damit verknüpften adrenalen Steroide (Cameron und Gould 1994) wirken sich hemmend aus.

Auf der anderen Seite regen pharmakologische und nicht-pharmakologische Therapien dieser Erkrankungen wie Antidepressiva (Malberg et al. 2000) und Tiefenhirnstimulation (Toda et al. 2008) diese an. Auch freiwillige körperliche Betätigung (Voluntary Exercise) (van Praag et al. 1999) und Lernen (Gould und Tanapat 1999) zeigen im Tierversuch einen positiven Effekt. Eine Steigerung der Neurogeneserate zeigt sich physiologisch nach fokalen zerebralen Ischämien erhöht und stellt einen wichtigen endogenen Reparaturversuch des Gehirns dar (Tureyen et al. 2004). Gleichzeitig ist eine erhöhte Neurogeneserate mit einem besseren Outcome im Langzeitverlauf assoziiert (Darsalia et al. 2005). Aus diesem Grund stellt die Erforschung neuer neurogenesefördernder Faktoren einen Schwerpunkt der Schlaganfallforschung dar. In diesem Zusammenhang kommt Wachstumsfaktoren wie dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor G-CSF eine große Rolle zu (Sehara et al. 2007). G-CSF induzierte in vorangegangenen Studien sowohl mehr neuronale Progenitorzellen in subkortikalen Regionen nahe des Infarktareals als auch eine gesteigerte Neurogenese im Gyrus Dentatus des Hippokampus (Schneider et al. 2005). Obwohl in unserer Arbeit die G-CSF-Behandlung bei alten Individuen die Anzahl proliferierender Zellen im Gyrus Dentatus und der Subventrikulären Zone steigerte, wies im Vergleich nur die SVZ der infarzierten Hemisphäre nach G-CSF-Gabe gesichert mehr neugeborene Neurone vor. Shyu et al. suggerierten als mögliche Erklärung vergleichbarer Funde in ihren Studien hierfür die einseitige Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und den dadurch selektiven Eintritt hämatopoetischer Stammzellen (Shyu et al. 2004) in die ischämischen Hirnregionen.

Diskussion

Genauso verbesserte in bisherigen Studien die alleinige oder mit dem Stammzellfaktor (SCF) kombinierte G-CSF-Gabe während chronischer zerebraler Ischämie das funktionelle Outcome, möglicherweise durch Begünstigung der Proliferation endogener neuronaler Stammzellen und Förderung der zytokininduzierten Generation neuronaler Zellen von aus dem Knochenmark stammenden Zellen (Kawada et al. 2006, Zhao et al. 2007)

Insgesamt konnten die bisher nur bei jungen Tieren dargestellten zellregenerativen Effekte in der vorliegenden Studie auch bei alten Tieren nachgewiesen werden.

6 Zusammenfassung und Transfer in klinische Studien

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse unserer Studie somit darauf hin, dass eine Behandlung alter Ratten mit G-CSF die funktionelle neurologische Wiederherstellung, das Überleben nach Schlaganfällen und die Neurogenese wahrscheinlich mittels komplexer, multimodaler Eingriffe und unterstützender zellulärer Prozesse positiv beeinflusst.

Diese Resultate sind bedeutend für zukünftige Behandlungsstrategien von Schlaganfällen bei älteren Patienten. Von besonderem Vorteil für den klinischen Einsatz könnte sein, dass das therapeutische Zeitfenster von G-CSF im Vergleich zur aktuellen Primärtherapie länger als 4,5 Stunden zu sein scheint (Minnerup et al. 2008).

Bereits jetzt gibt es schon erste klinische Erfolge eines G-CSF-Einsatzes bei Schlaganfallpatienten zu verzeichnen. In einer Pilotstudie von Sprigg et al. mit einer niedrigen Dosierung (1 bis 15 µg/kg Körpergewicht) (Sprigg et al. 2006) als auch einer weiteren klinischen Studie von Shyu et al., zeigte sich, dass eine G-CSF-Behandlung von Schlaganfallpatienten weder Ischämie noch Inflammation verstärkte, sondern sich vielmehr ein positiver Effekt auf die Erholung neurologischer Defizite andeutete (Shyu et al. 2006).

Auch in einer Studie unserer Arbeitsgruppe mit höherer G-CSF-Dosis (kumuliert bis zu 180 µg/kg Körpergewicht) traten keine negativen Auswirkungen zum Vorschein. Darüber hinaus gab es besonders bei Patienten mit großen Infarkt volumina Anzeichen für ein merklich verbessertes funktionelles Outcome (Schäbitz et al. 2008).

In der nächsten Zeit sind nun weitere Studien nötig um das Schema der G-CSF-Behandlung alter Individuen beispielsweise durch eine Verlängerung der G-CSF-Gabe auf mehr als zwei Wochen nach Schlaganfall zu optimieren und eine bestmögliche Dosierung zu ermitteln.

7 Abkürzungen

A.	Arteria
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BMI	Body-Mass-Index
BrdU	5-Bromo-2-Desoxyuridin
CD	Cluster of Differentiation
CHADS2	Risikobewertungsscore einer kardiogenen Embolie
Cl	Chlorid
CT	Computertomografie
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPO	Erythropoetin
ERK	Extrazelluläre Signal-Regulierte Kinase
GABA	γ -Aminobuttersäure
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
G-CSFR	Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor-Rezeptor
GD	Gyrus Dentatus
GDNF	Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor
GFAP	Saures Gliafaserprotein
G-MCSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HMG-COA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
IPSI	aus Sicht der Infarktseite ipsilateral
JAK2	Janus-Kinase 2
K ⁺	Kalium
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KL	aus Sicht der Infarktseite kontralateral
MANOVA	Multivariate Analyse der Varianz
MCA	A. cerebri media
MCAO	Middle Cerebral Artery Occlusion
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
MRT	Magnetresonanztomografie
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NeuN	Neuronen-spezifisches Nukleoides Protein
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
PI	Periinfarktareal/-zone
PI3K-Akt	Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pMCAO	Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion
RMS	Rostraler Migratorischer Strom
rt-PA	rekombinanter Gewebsplasminogen-Aktivator
SCF	Stammzellfaktor
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom
SSC	Standard Saline-Citrat
SGZ	Subgranuläre Zone
STAIR	Stroke Therapy Academic Industry Roundtable
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SVZ	Subventrikuläre Zone
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TIA	Transitorische Ischämische Attacke
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
U/min	Umdrehungen pro Minute
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Literaturverzeichnis

1. Alexis NE, Back T, Zhao W, Dietrich WD, Watson BD, Ginsberg MD (1996) Neurobehavioral consequences of induced spreading depression following photothrombotic middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 706 (2): 273-282
2. Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135: 1127-1128
3. Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J.Comp.Neurol.* 124 (3): 319-335
4. Aspey BS, Taylor FL, Terruli M, Harrison MJ (2000) Temporary middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke and reperfusion. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 26 (3): 232-242
5. Assmann G, Schulte H, Cullen P, Seedorf U (2007) Assessing risk of myocardial infarction and stroke: new data from the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Eur.J.Clin.Invest.* 37 (12): 925-932
6. Bacigaluppi M, Comi G, Hermann DM (2010) Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *Open Neurol.J.* 4: 34-38
7. Badan I, Buchhold B, Hamm A, Gratz M, Walker LC, Platt D, et al. (2003) Accelerated glial reactivity to stroke in aged rats correlates with reduced functional recovery. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 23 (7): 845-854
8. Barnett HJ (2002) Stroke prevention in the elderly. *Clin.Exp.Hypertens.* 24 (7-8): 563-571
9. Beck H, Plate KH (2009) Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.* 117 (5): 481-496
10. Begley CG, Lopez AF, Nicola NA, Warren DJ, Vadas MA, Sanderson CJ, et al. (1986) Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. *Blood* 68 (1): 162-166
11. Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci.Lett.* 291 (1): 17-20
12. Boneberg EM, Hareng L, Gantner F, Wendel A, Hartung T (2000) Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. *Blood* 95 (1): 270-276

13. Boneberg EM, Hartung T (2002a) Granulocyte colony-stimulating factor attenuates LPS-stimulated IL-1beta release via suppressed processing of proIL-1beta, whereas TNF-alpha release is inhibited on the level of proTNF-alpha formation. *Eur.J.Immunol.* 32 (6): 1717-1725
14. Boneberg EM, Hartung T (2002b) Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF. *Inflamm.Res.* 51 (3): 119-128
15. Bonita R (1998) The Coming Epidemic. *Lancet* (Supplement 4): 352
16. Brines M, Cerami A (2005) Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat.Rev.Neurosci.* 6 (6): 484-494
17. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG (2009) Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40 (5): e331-9
18. Buchhold B (2007) Funktionelle und zelluläre Veränderungen nach Schlaganfall im Tiermodell, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald
19. Buchhold B, Mogoanta L, Suofu Y, Hamm A, Walker L, Kessler C, et al. (2007) Environmental enrichment improves functional and neuropathological indices following stroke in young and aged rats. *Restor.Neurol.Neurosci.* 25 (5-6): 467-484
20. Cameron HA, Gould E (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61 (2): 203-209
21. Chan PH (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 21 (1): 2-14
22. Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG (2002) Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 134 (1-2): 13-21
23. Corti S, Locatelli F, Strazzer S, Salani S, Del Bo R, Soligo D, et al. (2002) Modulated generation of neuronal cells from bone marrow by expansion and mobilization of circulating stem cells with in vivo cytokine treatment. *Exp.Neurol.* 177 (2): 443-452
24. D'Agostino RB, Wolf PA, Belanger AJ, Kannel WB (1994) Stroke risk profile: adjustment for antihypertensive medication. The Framingham Study. *Stroke* 25 (1): 40-43
25. Darsalia V, Heldmann U, Lindvall O, Kokaia Z (2005) Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke* 36 (8): 1790-1795
26. del Rio JA, Soriano E (1989) Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 49 (2): 311-317
27. del Zoppo GJ (1994) Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. *Cerebrovasc.Brain Metab.Rev.* 6 (1): 47-96

28. Demetri GD, Zenzie BW, Rheinwald JG, Griffin JD (1989) Expression of colony-stimulating factor genes by normal human mesothelial cells and human malignant mesothelioma cells lines in vitro. *Blood* 74 (3): 940-946
29. Diederich K, Sevimli S, Dorr H, Kosters E, Hoppen M, Lewejohann L, et al. (2009) The role of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in the healthy brain: a characterization of G-CSF-deficient mice. *J.Neurosci.* 29 (37): 11572-11581
30. DiNapoli VA, Huber JD, Houser K, Li X, Rosen CL (2008) Early disruptions of the blood-brain barrier may contribute to exacerbated neuronal damage and prolonged functional recovery following stroke in aged rats. *Neurobiol.Aging* 29 (5): 753-764
31. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22 (9): 391-397
32. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J.Neurosci.* 17 (13): 5046-5061
33. Doetsch F, Scharff C (2001) Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals. *Brain Behav.Evol.* 58 (5): 306-322
34. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55 (3): 310-318
35. Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, Ren JM, Finklestein SP, Rau SW, et al. (1998) Estradiol protects against ischemic injury. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 18 (11): 1253-1258
36. England TJ, Gibson CL, Bath PM (2009) Granulocyte-colony stimulating factor in experimental stroke and its effects on infarct size and functional outcome: A systematic review. *Brain Res.Rev.* 62 (1): 71-82
37. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat.Med.* 4 (11): 1313-1317
38. Fitzmaurice D (2009) Atrial fibrillation and coagulation: who and when? *Blood Rev.* 23 (6): 241-244
39. Frampton JE, Lee CR, Faulds D (1994) Filgrastim. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. *Drugs* 48 (5): 731-760
40. Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287 (5457): 1433-1438
41. Gibson CL, Bath PM, Murphy SP (2005a) G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 25 (4): 431-439

42. Gibson CL, Jones NC, Prior MJ, Bath PM, Murphy SP (2005b) G-CSF suppresses edema formation and reduces interleukin-1beta expression after cerebral ischemia in mice. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 64 (9): 763-769
43. Goldstein LB (1993) Rapid reliable measurement of lesion parameters for studies of motor recovery after sensorimotor cortex injury in the rat. *J.Neurosci.Methods* 48 (1-2): 35-42
44. Gould E, Tanapat P (1999) Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol.Psychiatry* 46 (11): 1472-1479
45. Grotta JC (1999) Acute stroke therapy at the millennium: consummating the marriage between the laboratory and bedside. The Feinberg lecture. *Stroke* 30 (8): 1722-1728
46. Hacke W, Albers G, Al-Rawi Y, Bogousslavsky J, Davalos A, Eliasziw M, et al. (2005a) The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS): a phase II MRI-based 9-hour window acute stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase. *Stroke* 36 (1): 66-73
47. Hacke W, Albers G, Al-Rawi Y, Bogousslavsky J, Davalos A, Eliasziw M, et al. (2005b) The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS): a phase II MRI-based 9-hour window acute stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase. *Stroke* 36 (1): 66-73
48. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, et al. (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N.Engl.J.Med.* 359 (13): 1317-1329
49. Hagg T (2009) From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *Neuroscientist* 15 (1): 20-27
50. Han JL, Blank T, Schwab S, Kollmar R (2008) Inhibited glutamate release by granulocyte-colony stimulating factor after experimental stroke. *Neurosci.Lett.* 432 (3): 167-169
51. Haring HP (2002) Hirninfarkt. In: Hamann GF, Siebler M, von Scheidt W (Hrsg) Schlaganfall: Klinik, Diagnostik, Therapie; interdisziplinäres Handbuch. ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG, Landsberg/Lech, S. 134-136
52. Hartung T (1998) Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr.Opin.Hematol.* 5 (3): 221-225
53. Hattori K, Lee H, Hurn PD, Crain BJ, Traystman RJ, DeVries AC (2000) Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 31 (8): 1939-1944
54. Heuschmann PU, Berger K, Misselwitz B, Hermanek P, Leffmann C, Adelman M, et al. (2003) Frequency of thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke and the risk of in-hospital mortality: the German Stroke Registers Study Group. *Stroke* 34 (5): 1106-1113

55. Hu B, Yasui K (1997) Effects of colony-stimulating factors (CSFs) on neutrophil apoptosis: possible roles at inflammation site. *Int.J.Hematol.* 66 (2): 179-188
56. Ichiishi E, Yoshikawa T, Kogawa T, Yoshida N, Kondo M (2000) Possible paracrine growth of adenocarcinoma of the stomach induced by granulocyte colony stimulating factor produced by squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Gut* 46 (3): 432-434
57. Kawada H, Takizawa S, Takanashi T, Morita Y, Fujita J, Fukuda K, et al. (2006) Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation* 113 (5): 701-710
58. Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, Abe H, Hirai M, Kurosawa S, et al. (1990) Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood* 76 (10): 1962-1964
59. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M (2001) Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J.Biol.Chem.* 276 (42): 39469-39475
60. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94 (19): 10409-10414
61. Kempermann G, Kuhn HG, Winkler J, Gage FH (1998) New nerve cells for the adult brain. Adult neurogenesis and stem cell concepts in neurologic research. *Nervenarzt* 69 (10): 851-857
62. Kempermann G, Gast D, Gage FH (2002) Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann.Neurol.* 52 (2): 135-143
63. Kempermann G, Wiskott L, Gage FH (2004) Functional significance of adult neurogenesis. *Curr.Opin.Neurobiol.* 14 (2): 186-191
64. Koeffler HP, Gasson J, Ranyard J, Souza L, Shepard M, Munker R (1987) Recombinant human TNF alpha stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 70 (1): 55-59
65. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU (2002) Incidence, etiology and long-term prognosis of stroke. *Fortschr Neurol.Psychiatr.* 70 (12): 657-662
66. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundorfer B, et al. (2006) Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke* 37 (5): 1179-1183
67. Komine-Kobayashi M, Zhang N, Liu M, Tanaka R, Hara H, Osaka A, et al. (2006) Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 26 (3): 402-413

68. 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): 2027-2033
69. Lee ST, Chu K, Jung KH, Ko SY, Kim EH, Sinn DI, et al. (2005) Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1058 (1-2): 120-128
70. Leker RR, Shohami E (2002) Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 39 (1): 55-73
71. Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97 (20): 11032-11037
72. Lilly MB, Devlin PE, Devlin JJ, Rado TA (1987) Production of granulocyte colony-stimulating factor by a human melanoma cell line. *Exp.Hematol.* 15 (9): 966-971
73. Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90 (5): 2074-2077
74. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ (2006) Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367 (9524): 1747-1757
75. Luders S, Schrader J (2009) Prevention of stroke: what is evidence based? *Internist (Berl)* 50 (12): 1337-1344
76. MacMahon S, Rodgers A (1996) Primary and secondary prevention of stroke. *Clin.Exp.Hypertens.* 18 (3-4): 537-546
77. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J.Neurosci.* 20 (24): 9104-9110
78. Masuhr K, Neumann M (2007) In: *Duale Reihe - Neurologie.* Thieme, Stuttgart, S. 390
79. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U (2005) Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat.Rev.Neurosci.* 6 (10): 775-786
80. Metcalf D, Nicola NA (1983) Proliferative effects of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells. *J.Cell.Physiol.* 116 (2): 198-206
81. Minnerup J, Heidrich J, Wellmann J, Rogalewski A, Schneider A, Schabitz WR (2008) Meta-analysis of the efficacy of granulocyte-colony stimulating factor in animal models of focal cerebral ischemia. *Stroke* 39 (6): 1855-1861

82. Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H (2000) Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J.Neurosci.Methods* 104 (1): 99-109
83. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116 (1): 201-211
84. Mumenthaler M (2008a) In: *Neurologie*. Thieme, Stuttgart, S. 134
85. Mumenthaler M (2008b) In: *Neurologie*. Thieme, Stuttgart, S. 121
86. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, et al. (1986) Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 319 (6052): 415-418
87. Nicola NA, Metcalf D (1985) The colony-stimulating factors and myeloid leukaemia. *Cancer Surv.* 4 (4): 789-815
88. NINDS (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N.Engl.J.Med.* 333 (24): 1581-1587
89. Olton DS, Papas BC (1979) Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 17 (6): 669-682
90. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98 (18): 10344-10349
91. Pasternak G (1997) Monoklonale Antikörpertechnik. In: Ganten A (Hrsg) *Handbuch der molekularen Medizin*. Springer Verlag, Berlin, Bd. Band I, S. 145-173
92. Philip M, Benatar M, Fisher M, Savitz SI (2009) Methodological quality of animal studies of neuroprotective agents currently in phase II/III acute ischemic stroke trials. *Stroke* 40 (2): 577-581
93. Piao CS, Gonzalez-Toledo ME, Xue YQ, Duan WM, Terao S, Granger DN, et al. (2009) The role of stem cell factor and granulocyte-colony stimulating factor in brain repair during chronic stroke. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 29 (4): 759-770
94. Popa-Wagner A, Schroder E, Walker LC, Kessler C (1998) beta-Amyloid precursor protein and ss-amyloid peptide immunoreactivity in the rat brain after middle cerebral artery occlusion: effect of age. *Stroke* 29 (10): 2196-2202
95. Popa-Wagner A, Badan I, Walker L, Groppa S, Patrana N, Kessler C (2007) Accelerated infarct development, cytogenesis and apoptosis following transient cerebral ischemia in aged rats. *Acta Neuropathol.* 113 (3): 277-293
96. Ramon y Cayal S (1928) *Degeneration and regeneration of the nervous system*. Oxford UP, London

97. Reglodi D, Tamas A, Lengvari I (2003) Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.Bull.* 59 (6): 459-466
98. Rivlin AS, Tator CH (1977) Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J.Neurosurg.* 47 (4): 577-581
99. Roberts AW (2005) G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors* 23 (1): 33-41
100. Rogalewski A, Schabitz WR (2008) Development of new stroke therapies: outlook for neuroprotective drugs. *Nervenarzt* 79 (2): 218-224
101. Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB (1997) Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 28 (10): 2060-5; discussion 2066
102. Rosen CL, Dinapoli VA, Nagamine T, Crocco T (2005) Influence of age on stroke outcome following transient focal ischemia. *J.Neurosurg.* 103 (4): 687-694
103. Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Lovelock CE, et al. (2005) Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet* 366 (9499): 1773-1783
104. Schabitz WR, Laage R, Schwab S, Schneider D, Hamann G, Rosenkranz M, et al. (2008) AX200 (G-CSF) for the Treatment of Acute Ischemic Stroke (AXIS). *Int. Stroke Conference, New Orleans*
105. Schabitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Scholzke MN, et al. (2003) Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke* 34 (3): 745-751
106. Schneider A, Kruger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, et al. (2005) The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J.Clin.Invest.* 115 (8): 2083-2098
107. Schneider A, Wysocki R, Pitzer C, Kruger C, Laage R, Schwab S, et al. (2006) An extended window of opportunity for G-CSF treatment in cerebral ischemia. *BMC Biol.* 4: 36
108. Sehara Y, Hayashi T, Deguchi K, Zhang H, Tsuchiya A, Yamashita T, et al. (2007) Potentiation of neurogenesis and angiogenesis by G-CSF after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1151: 142-149
109. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J.Neurosci.* 21 (18): 7153-7160

110. Sevimli S, Diederich K, Strecker JK, Schilling M, Klocke R, Nikol S, et al. (2009) Endogenous brain protection by granulocyte-colony stimulating factor after ischemic stroke. *Exp.Neurol.* 217 (2): 328-335
111. Sheridan WP, Morstyn G, Wolf M, Dodds A, Lusk J, Maher D, et al. (1989) Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 2 (8668): 891-895
112. Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, Tzeng YS, Pang CY, Yen PS, et al. (2004) Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation* 110 (13): 1847-1854
113. Shyu WC, Lin SZ, Lee CC, Liu DD, Li H (2006) Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *CMAJ* 174 (7): 927-933
114. Six I, Gasan G, Mura E, Bordet R (2003) Beneficial effect of pharmacological mobilization of bone marrow in experimental cerebral ischemia. *Eur.J.Pharmacol.* 458 (3): 327-328
115. Solaroglu I, Cahill J, Tsubokawa T, Beskonakli E, Zhang JH (2009) Granulocyte colony-stimulating factor protects the brain against experimental stroke via inhibition of apoptosis and inflammation. *Neurol.Res.* 31 (2): 167-172
116. Souza LM, Boone TC, Gabrilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, et al. (1986) Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 232 (4746): 61-65
117. Sprigg N, Bath PM, Zhao L, Willmot MR, Gray LJ, Walker MF, et al. (2006) Granulocyte-colony-stimulating factor mobilizes bone marrow stem cells in patients with subacute ischemic stroke: the Stem cell Trial of recovery EnhanceMent after Stroke (STEMS) pilot randomized, controlled trial (ISRCTN 16784092). *Stroke* 37 (12): 2979-2983
118. Sprigg N, Bath PM (2007) Colony Stimulating Factors (Blood Growth Factors) Are Promising but Unproven for Treating Stroke. *Stroke*
119. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Iocolano M, Ammedolia L, et al. (1997) The effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor on vascular dysfunction and splanchnic ischaemia-reperfusion injury. *Br.J.Pharmacol.* 120 (2): 333-339
120. STAIR (1999) Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 30 (12): 2752-2758
121. Statistisches Bundesamt [Hrsg] (2005) Statistisches Jahrbuch 2005 für die Bundesrepublik Deutschland., Wiesbaden
122. Suzuki S, Brown CM, Wise PM (2009) Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Front.Neuroendocrinol.* 30 (2): 201-211

123. Tan Z, Li X, Kelly KA, Rosen CL, Huber JD (2009) Plasminogen activator inhibitor type 1 derived peptide, EEIIMD, diminishes cortical infarct but fails to improve neurological function in aged rats following middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 1281: 84-90
124. Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E (2001) Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J.Comp.Neurol.* 437 (4): 496-504
125. Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O (2007) Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38 (11): 3032-3039
126. Toda H, Hamani C, Fawcett AP, Hutchison WD, Lozano AM (2008) The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation. *J.Neurosurg.* 108 (1): 132-138
127. Toth ZE, Leker RR, Shahar T, Pastorino S, Szalayova I, Asemenew B, et al. (2008) The combination of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor significantly increases the number of bone marrow-derived endothelial cells in brains of mice following cerebral ischemia. *Blood* 111 (12): 5544-5552
128. Tureyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Bowen KK, Dempsey RJ (2004) Transient focal cerebral ischemia-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the adult mouse. *J.Neurosurg.* 101 (5): 799-805
129. Tweardy DJ, Cannizzaro LA, Palumbo AP, Shane S, Huebner K, Vantuinen P, et al. (1987) Molecular cloning and characterization of a cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) from a glioblastoma multiforme cell line and localization of the G-CSF gene to chromosome band 17q21. *Oncogene Res.* 1 (3): 209-220
130. van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96 (23): 13427-13431
131. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415 (6875): 1030-1034
132. Vellenga E, Rambaldi A, Ernst TJ, Ostapovicz D, Griffin JD (1988) Independent regulation of M-CSF and G-CSF gene expression in human monocytes. *Blood* 71 (6): 1529-1532
133. Wang LC, Futrell N, Wang DZ, Chen FJ, Zhai QH, Schultz LR (1995) A reproducible model of middle cerebral infarcts, compatible with long-term survival, in aged rats. *Stroke* 26 (11): 2087-2090
134. Watari K, Asano S, Shirafuji N, Kodo H, Ozawa K, Takaku F, et al. (1989) Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. *Blood* 73 (1): 117-122

135. Weber R, Ramos-Cabrer P, Justicia C, Wiedermann D, Strecker C, Sprenger C, et al. (2008) Early prediction of functional recovery after experimental stroke: functional magnetic resonance imaging, electrophysiology, and behavioral testing in rats. *J.Neurosci.* 28 (5): 1022-1029
136. Weiss M, Gross-Weege W, Harms B, Schneider EM (1996) Filgrastim (RHG-CSF) related modulation of the inflammatory response in patients at risk of sepsis or with sepsis. *Cytokine* 8 (3): 260-265
137. Welte K, Platzer E, Lu L, Gabilove JL, Levi E, Mertelsmann R, et al. (1985) Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82 (5): 1526-1530
138. Wiesner G, Grimm J, Bittner E (1999) Schlaganfall: Prävalenz, Inzidenz, Trend, Ost-West-Vergleich - Erste Ergebnisse aus dem Bundes-Gesundheitssurvey 1998. *Gesundheitswesen* 61 Sonderheft 2: 79-84
139. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K, et al. (2004) Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 110 (20): 3213-3220
140. Xiao BG, Lu CZ, Link H (2007) Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection. *J.Cell.Mol.Med.* 11 (6): 1272-1290
141. Yanqing Z, Yu-Min L, Jian Q, Bao-Guo X, Chuan-Zhen L (2006) Fibronectin and neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor in focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1098 (1): 161-169
142. Zhang L, Zhang RL, Wang Y, Zhang C, Zhang ZG, Meng H, et al. (2005) Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Stroke* 36 (4): 847-852
143. Zhao LR, Berra HH, Duan WM, Singhal S, Mehta J, Apkarian AV, et al. (2007) Beneficial effects of hematopoietic growth factor therapy in chronic ischemic stroke in rats. *Stroke* 38 (10): 2804-2811
144. Zsebo KM, Yuschenkoff VN, Schiffer S, Chang D, McCall E, Dinarello CA, et al. (1988) Vascular endothelial cells and granulopoiesis: interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. *Blood* 1988 Jan;71(1):99-103

9 Lebenslauf

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. W.R. Schäbitz für die Überlassung des Themas, Bereitstellung sämtlicher Materialien und vor allem für die richtungweisende fachliche Unterstützung.

Im Rahmen der Kooperationszusammenarbeit mit der Universität Greifswald möchte ich der Laborgruppe um Prof. Dr. A. Popa-Wagner danken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

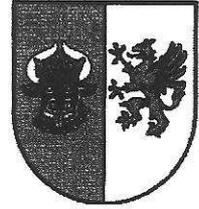
Des Weiteren danke ich vielmals Dr. rer. med. B. Buchhold für die Fotos und Informationen bezüglich der Verhaltenstests aus ihren Arbeiten.

Großer Dank gebührt allen Labormitarbeitern der Neurologie des UKM. Hervorzuheben sind hier Kai Diederich, welcher bei Fragen in jeder Hinsicht immer den passenden, freundlichen Rat parat hatte, und Maïke Hoppen, welche mich auch in schwierigsten Phasen der IHC-Experimente tatkräftig unterstützt und niemals aufgegeben hat.

Zuletzt gebührt meinen Eltern größter Dank, die mich auf meinem gesamten Lebensweg bisher in jeder Hinsicht unter die Arme gegriffen haben. Schlussendlich wäre durch ihre Unterstützung die Aufnahme der Doktorandentätigkeit von vornherein nicht zu realisieren gewesen.

Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern

-Abt.: 6 Veterinärdienste, Ernährungswirtschaft, Tierzucht-



LALLF MV • Postfach 10 20 64 • 18003 Rostock

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Klinik für Neurologie
z. Hd. Herrn Prof. Dr. Aurel Popa-Wagner
Ellernholzstr. 1-2

17489 Greifswald

Dienstgebäude: Thierfelderstraße 18
18059 Rostock
Telefon: 0381 / 40 35 - 0
Telefax: 0381 / 4 00 15 10
Email: Tierversuchswesen@lallf.mvnet.de

Bearbeitet von: Herrm Dr. Krey,
Frau Bauschke
Tel. Durchwahl: -621, -601
Aktenzeichen: LALLF M-V/TSD/
7221.3-1.1-052/08
Ort, Datum: Rostock, 25.11.2008

Nachrichtlich:

Landkreis Ostvorpommern
Veterinär- u. Lebensmittelüberwachungsamt
Herrn Dr. Vogel
PF 1239
17382 Anklam

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Institut für Physiologie
Herrn Dr. Grisk - TierSchB
Greifswalder Straße 11c
17495 Karlsburg

Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren

Ihr Antrag vom: 18.08.2008, zuletzt ergänzt am 14.11.2008
Eingang im LALLF: 21.08.2008 bzw. 17.11.2008
Aktenzeichen: LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-052/08

Sehr geehrter Herr Professor Popa-Wagner,

1. Hiermit erteile ich Ihnen die **Genehmigung** zur Vornahme wissenschaftlicher Versuche an 73 Sprague Dawley Ratten.
2. Diese Genehmigung gilt ab Bekanntgabe bis zum **31.12.2010**.
3. Die Genehmigung wird unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs erteilt.
4. Dieser Bescheid ist nicht gebührenpflichtig.

Hauptsitz
Post: Postfach 10 20 64 18003 Rostock
Haus: Thierfelderstr. 18 18059 Rostock
Website: www.lallf.de

 **AKS** Akkreditiertes Prüflaboratorium
Register-Nr. AKS-P-11301-EU
Staatliche Akkreditierungsstelle Hannover

052_08.doc Seite 1/3

Begründung

Sachverhalt

Mit o. g. Schreiben haben Sie die Genehmigung Ihres Versuchsvorhabens mit der

Bezeichnung: *„Funktionelle Wiederherstellung nach Schlaganfall durch Verstärkung der endogenen Neurogenese bei alten Ratten“*

Kurzbezeichnung: *„Neurogenesis und Stroke – NGS“*

Versuchstierhaltung / Versuchsdurchführung: *Labor für molekulare Neurobiologie der Klinik für Neurologie der Universität Greifswald, Ellernholzstr. 1-2, 17489 Greifswald*

Verantwortliche Leitung: *Herr Prof. Dr. Aurel Popa-Wager*

Stellvertretende Leitung: *Herr Dr. Michael Sabolek*

beantragt. Es wurde von der Tierversuchskommission am 22.10.2008 grundsätzlich zur Genehmigung empfohlen. Die Fragen der Kommission haben Sie auf mein Schreiben vom 28.10.2008 hin am 14.11.2008 beantwortet.

Aus den Gründen

Meine Zuständigkeit für die Entscheidung über Ihren Versuchsantrag ergibt sich aus § 3 Nr. 3 des Gesetzes über Zuständigkeiten auf dem Gebiet des Tierschutzrechtes (TierSchZG M-V) in der Fassung der Bekanntmachung vom 28. September 2000 (GVOBl. M-V 2000, 514).

Ihr Vorhaben wird gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206) **genehmigt** und gemäß § 36 Abs. 1 Satz 1 2. Alt. des Landesverwaltungsverfahrensgesetz Mecklenburg-Vorpommern in der Fassung der Bekanntmachung vom 26. Februar 2004 (GVOBl. M-V, S. 106) mit den o. g. Nebenbestimmungen verbunden.

Die erteilte Genehmigung umfasst antragsgemäß den Einsatz von **maximal 73 Sprague Dawley Ratten**. Damit folge ich in meiner Entscheidung auch der Empfehlung der Kommission, die die beantragte Anzahl an Versuchstieren für erforderlich und Ihr Versuchsvorhaben insgesamt für ethisch vertretbar erachtet hat.

Diese Genehmigung gilt antragsgemäß für den auf Seite 1 genannten Zeitraum. Die Notwendigkeit der Befristung Ihres Versuchsvorhabens ergibt sich aus § 8 Abs. 5 S. 1 des Tierschutzgesetzes in Verbindung mit Punkt 6.4.3 der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift zur Durchführung des Tierschutzgesetzes vom 09. Februar 2000 (BAnz. Beilage Nr. 36a vom 22. Februar 2000). Danach ist die Genehmigung auf **höchstens drei Jahre** zu befristen. Sie kann auf formlosen, mit Gründen versehenen Antrag **höchstens zweimal um jeweils ein Jahr verlängert** werden.

Der unter Punkt 3 verfügte Widerrufsvorbehalt dient der Beachtung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes. Es soll erreicht werden, dass ein Widerruf dieser Genehmigung zulässig ist, wenn die Voraussetzungen des § 8 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir gesetzten Frist abgeholfen wird. Die Genehmigung kann widerrufen werden, wenn ihre Beschränkungen oder Auflagen nicht eingehalten werden oder Tierversuche entgegen einer tierschutzrechtlichen Norm durchgeführt werden.

Dieser Bescheid ist nicht gebührenpflichtig, da für Ihre Einrichtung die persönliche Gebührenfreiheit gemäß § 8 Abs. 1 des Verwaltungskostengesetzes des Landes Mecklenburg-Vorpommern in der Fassung der Bekanntmachung vom 04. Oktober 1991 (GVOBl. M-V, S. 306) besteht.

Hinweise

1. Für die Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes sowie der hier erteilten Nebenbestimmungen ist der in dieser Genehmigung bezeichnete Leiter des Versuchsvorhabens oder die in dieser Genehmigung bezeichnete Vertretung verantwortlich.
Jeder beabsichtigte **Wechsel** des genannten Leiters oder der genannten Vertretung ist mir **zuvor** unverzüglich schriftlich zu **melden**. Die Genehmigung gilt dann weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats von mir widerrufen wird.
2. Diese Genehmigung gilt nur für die Art, Durchführung und Dauer der Eingriffe oder Behandlungen im Umfang des von Ihnen beantragten Tierversuchsvorhabens. Jede beabsichtigte Abweichung vom Antrag einschließlich aller Anlagen und Ergänzungen dazu ist mir zuvor rechtzeitig – über den Tierschutzbeauftragten – anzuzeigen. **Ohne Genehmigung dürfen keine Veränderungen vorgenommen werden.**
Änderungen bedürfen nicht der Genehmigung sondern nur der vorherigen Anzeige, wenn der Zweck des Versuchsvorhabens beibehalten wird, den Versuchstieren keine stärkeren Schmerzen, Leiden oder Schäden entstehen und auch die Versuchstierzahl nicht wesentlich erhöht wird.
3. Die nach § 9 a des Tierschutzgesetzes vorgeschriebenen Aufzeichnungen sind begleitend für jeden Einzelversuch zu führen. Sie sind nach amtlichem Muster (Anlage) vorzunehmen und drei Jahre lang nach Abschluss des Versuchsvorhabens aufzubewahren.
4. Die im Versuch zu Tode kommenden Tiere sind gemäß den Grundsätzen der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 03. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte (ABl. EG L 273/1) i.V.m. dem Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz vom 25. Januar 2004 (BGBl. I S. 82) der Beseitigungspflichtigen (SecAnim GmbH in Malchin) zu melden und zu überlassen. Vor der Beseitigung dürfen Tierkörper zu diagnostischen Untersuchungen in tierärztliche Untersuchungseinrichtungen verbracht werden.
5. Auf die Meldepflicht für Tierversuche nach der Versuchstiermeldeverordnung (nach dem Muster der Anlagen zu dieser Verordnung für jedes Kalenderjahr nachträglich bis spätestens 31. März des Folgejahres) erlaube ich mir hinzuweisen.
6. Ebenso weise ich Sie auf die Straf- und Bußgeldtatbestände der §§ 17 bis 20 des Tierschutzgesetzes bei Zuwiderhandlungen gegen dieses Gesetz hin.

Ich empfehle Ihnen, dieses Genehmigungsschreiben allen an der Versuchsdurchführung beteiligten Personen zur Kenntnis zu geben.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist schriftlich oder zur Niederschrift beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Thierfelderstr. 18 in 18059 Rostock (Postanschrift: Postfach 10 20 64, 18003 Rostock) einzulegen.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag


Dr. Mathias Krey