Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf photothrombotisch fokale Läsionen im Repräsentationsareal der hinteren Extremität des Rattenhirns

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Evelyn Angelique Oermann aus Düsseldorf

> > Düsseldorf 2000

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Univ. Prof. Dr. med. K. Zilles Korreferent: Univ. Prof. Dr. rer. nat. W.-R. Schlue Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.00

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	
1.1 Schlaganfall: Ursachen und Auswirkungen	1
1.2 Schlaganfall im Tiermodell	7
1.3 Enzymatische Mechanismen in postischämischen Prozessen	10
1.3.1 Hämoxygenase-1	10
1.3.2 Cyclooxygenase-2	12
1.3.3 Glial-feinfaserig-säurehaltiges-Protein	14
1.4 Was ist Vitamin D und wie wirkt es?	15
1.4.1 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃	15
1.4.2 Protektion durch 1,25-Dihydroxyvitamin D_3	18
1.5 Fragestellung	20
2 Material und Methoden	
2.1 Chemikalien und Geräte	21
2.2 Die Versuchstiere	22
2.2.1 Präparation der Gehirne	24
2.2.2 Histologische Präparation	25
2.3 Immunhistochemische Untersuchungen	25
2.3.1 HO-1 Antikörperfärbung	26
2.3.2 COX-2 Antikörperfärbung	27
2.3.3 GFAP Antikörperfärbung	28
2.4 Kolokalisation mittels Doppelimmunfluoreszenz	29
2.4.1 HO-1 und GFAP	29
2.4.2 HO-1 und OX-42	30
2.4.3 HO-1 und MAG	30
2.5 Methodik der Auswertung	32
2.5.1 Immunhistochemische Färbungen	32
2.5.2 Doppelimmunfluoreszenz	35
2.5.3 Datenanalyse	36

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemie	39
3.1.1 Verteilung HO-1 immunoreaktiver Gliazellen	39
3.1.2 Verteilung COX-2 immunoreaktiver Neurone	55
3.1.3 Verteilung GFAP immunoreaktiver Astrozyten	67
3.2 Doppelimmunfluoreszenz	78
3.2.1 HO-1 und GFAP	78
3.2.2 HO-1 und OX-42	79
3.2.3 HO-1 und MAG	80
4 Diskussion	
4.1 Generelle Aspekte	81
4.2 Methodische Aspekte	82
4.2.1 Standardversuchsbedingungen	82
4.2.2 Das Modell des Schlaganfalls	83
4.2.3 Wirkung applizierter Substanzen	84
4.2.4 Vor- und Nachteile der verschiedenen Quantifizierungsmethoden	87
4.3 Auswirkungen des Infarktes auf das Gewebe im Photothrombose-Modell	88
4.3.1 Ödeme	88
4.3.2 Die Faserdegeneration	88
4.3.3 Marker im Modell der Photothrombose	89
4.4 Interpretation der Ergebnisse der Antigen-Anfärbung	90
4.4.1 Allgemeines	90
4.4.2 HO-1 Färbung	92
4.4.3 COX-2 Färbung	95
4.4.4 GFAP Färbung	98
4.5 Interpretation der Zelltypbestimmung mittels Kolokalisations-Untersuchungen	100
4.5.1 HO-1 und GFAP	100
4.5.2 HO-1 und OX-42	100
4.5.3 HO-1 und MAG	100
4.6 Der protektive Effekt von 1,25 Dihydroxyvitamin D ₃	101
5 Zusammenfassung	105
6 Literaturverzeichnis	107

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis	119
7.2 Diagramme	120
7.3 Antikörper-Kontrollen	130
8 Danksagung	131
9 Lebenslauf	
9.1 Tabellarischer Lebenslauf	132
9.2 Kongresse	133
9.3 Veröffentlichungen	134

1 Einleitung

1.1 Schlaganfall: Ursachen und Auswirkungen

Ursachen:

Schlaganfälle äußern sich durch einen plötzlich auftretenden Verlust neurologischer Funktionen, welche durch zwei verschiedene Prozesse ausgelöst werden können:

- Thrombosen, die zu einem Verschluss kleinerer oder größerer Blutgefäße führen, welche die verschiedenen Bereiche des Gehirns versorgen.
- Hämorrhagien, die durch Ruptur eines Gefäßes zur Einblutung und Kompression des Hirngewebes führen.

Von diesen beiden Ursachen kommt die erste, welche zu ischämischen Prozessen führt, am häufigsten vor (90%) und wird je nach Anzahl der verschlossenen Gefäße in singulär- und multifokale Verschlüsse untergliedert.

Auswirkungen:

Als Folge derartiger Verschlüsse kommt es durch Unterversorgung mit Sauerstoff zu Funktions- und Gewebeschädigungen im Gehirn, die in mehreren Stufen ablaufen (Sweeny et al., 1995; Choi 1996; Hamann, 1997). Die einzelnen Stufen sollen zunächst aufgelistet und anschließend erläutert werden:

- 1. Energiemangel
- 2. exzitatorische Phase mit übermäßiger Glutamatausschüttung
- 3. erhöhter Kalziumeinstrom in die Zelle
- 4. Bildung freier Radikale
- 5. Proteasenaktivierung
- 6. Proteinsynthesestörung
- 7. Proteinnitrierung
- 8. Membranstörungen
- 9. Ödementwicklung
- 10. Mikrovaskuläre Störungen
- 11. Reperfusionsschäden

- Zerebrale Ischämie verringert schnell die Konzentrationen des Sauerstoffes und der metabolischen Substrate im Gewebe (Silver and Erecinska, 1994), was zu einem <u>Energiemangel</u> führt. Auch bei der unvollständigen Ischämie (Yoshida et al., 1982; Ekholm et al., 1993; Saris and Eriksson, 1995) können Sauerstoff und Glucose, die zur ATP-Produktion benötigt werden, innerhalb von 2 Minuten auf ein kaum noch nachweisbares Niveau in den betroffenen Gehirnregionen absinken. Aufgrund dieses ATP-Mangels wird der anaerobe Glykolyse-Stoffwechsel aktiviert, wodurch die Reserven an Glucose und Glycogen in ATP umgewandelt werden, jedoch nur einen Zeitraum von 2 bis 3 Minuten überbrücken. Dabei entstehen über den Abbau des Zwischenproduktes Pyruvat verschiedene Gärungsprodukte, unter anderem Lactat, welches zum Absinken des zytosolischen pH-Wertes führt. Trotz nachfolgend einsetzender ATP-Gewinnung durch Creatin-Kinase und Adenylat-Cyclase ist ca. 4 bis 6 Minuten nach Einsetzen der Ischämie das ATP vollständig erschöpft.
- 2. Diese metabolischen Störungen und ihre Auswirkungen auf das Zytosol und die Membranen führen in den Neuronen sehr schnell zu unkontrollierter <u>Freisetzung</u> <u>exzitatorischer Neurotransmitter</u>. Die Wiederaufnahme von Glutamat z.B. in die Präsynapsen bzw. in die Gliazellen ist aufgrund des Energiemangels nicht mehr gewährleistet. Zudem führt eine Zelldepolarisation durch Funktionsstörung von ATPabhängigen Ionenpumpen zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat, welches wiederum sehr schnell die sogenannte postläsionale Hyperexzitation auslöst, die als Ursache für den Kalziumanstieg im Zytosol gilt.
- 3. Bei der postischämischen Schadenskaskade ist entscheidend, dass es durch die Aktivierung der Glutamatrezeptoren zur Öffnung von Ca²⁺ Kanälen kommt, die zu einem drastischen Anstieg von Kalzium im Zytosol führen. Da über die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration sowohl "second messenger" wie auch viele Ca²⁺-abhängige Enzyme in ihrer Aktivität kontrolliert werden, kommt es zu einer Deregulation dieser Ca²⁺-abhängigen Prozesse. Sehr gut beschrieben ist hierzu der Aktivitätsanstieg Ca²⁺-abhängiger Enzyme über das physiologische Maß hinaus, so z.B. bei den konstitutiven Formen der NOS (eNOS und nNOS; Blumberg et al., 1999; Iadecola et al., 1997).

4. Als Folge dieser Prozesse treten <u>freie Radikale</u> auf, die meist Metabolite von O₂, N₂, H₂ und S₂ sind. Ein biochemischer Hinweis auf die Bildung von Radikalen ergibt sich aus der Reduktion endogener Antioxidantien wie Ascorbat, Glutathion, Ubiquinon und α-Tocopherol im Hirngewebe. An der Bekämpfung freier Radikale sind endogene Enzyme wie Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase und Glutathion-Peroxidase beteiligt. Bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen kann die Schädigung des Gewebes, die durch freie Radikale verursacht wird, mit Defekten im Gencode für CuZn-SOD in Zusammenhang gebracht werden, das ein wichtiges endogenes Antioxidanz ist (Andersen et al., 1996; Shibata et al., 1996; Szabo, 1996). Das defekte Gen führt zu einem Überschuss an freien Radikalen, die vermutlich an der Gewebebeschädigung und am Zelltod während der Ischämie und Reperfusion mitverantwortlich sind.

Freie Radikale rufen außerdem sekundäre Schädigungen in Lipiden, Proteinen und der DNA hervor. Diese Angriffsziele werden in der folgenden Tabelle 1 aufgeführt:

Ziel	Effekt
Lipide	Peroxidation von Fettsäuren und Cholesterol,
-	Änderung der Membrandurchlässigkeit und Flüssigkeit
Proteine	Oxidierung von SH-Gruppen,
	Stimulierung von Phospholipasen,
	Inaktivierung durch Nitrierung (z.B. Mn-SOD, PCS)
	Inhibierung von Na, K-ATPase, Adenylcyclase und Ca-ATPase
DNA	Strang-Schnitt,
	Aktivierung der Poly (ADP-Ribose)- Polymerase

Tabelle 1: Effekte freier Radikale auf Lipide, Proteine und Nukleinsäure-Metabolismus (nach Farooqui et al., 1994).

5. Der erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Anstieg hat nicht allein Anteil an der Bildung von Radikalen, er ruft auch eine Anzahl weiterer sekundärer Schäden hervor. Dazu zählt die <u>Aktivierung von Proteasen</u>, wie z.B. Ca²⁺-abhängiger Calpaine, die das Zytoskelett und insbesondere Spektrine und Mikrotubuli zerstören (Kitagawa et al., 1999), außerdem die Proteinkinase C und Phospholipase A2 (siehe Tab. 1). Weiterhin kommt es zu einer Synthesesteigerung des Ca²⁺-abhängigen Enzyms NO und einer DNA-Fragmentierung (Dawson und Dawson, 1998).

- 6. Anschließend erfolgt eine <u>Proteinsynthesestörung</u>, die sich sowohl als reduzierte Synthese neuer Proteine wie auch als Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur von bereits gebildeten Proteinen äußern kann. Trotz dieser umfassenden Protein-Hemmung kommt es durch die Ischämie zur Induktion von Hitzeschock-Proteinen und weiteren frühen Transkriptionsfaktoren (c-fos, c-jun). Ob letztere einen positiven oder negativen Einfluss auf den Infarkt haben, ist noch ungeklärt, da sie in Experimenten sowohl zur Reduktion des Infarktes wie auch zur Induktion der Apoptose geführt haben (An et al., 1993). Neben den Calpainen (Kitagawa et al., 1999) und Caspasen (Ni et al., 1998) werden außerdem extrazelluläre Matrixmetallo-Proteinasen aktiviert, die eine wichtige Rolle bei Ödemen und Blutungen spielen (Hamann et al., 1996).
- 7. Die Nitrierung von Proteinen und die dadurch ausgelöste Inaktivierung ist ein weiterer Aspekt, hervorgerufen durch oxidativen Stress. Aufgrund von Reperfusion des ischämischen Gewebes kommt es zu gleichzeitiger Freisetzung von NO und Superoxid, welche zu Peroxynitrit reagieren, falls nicht zuvor die Superoxid-Dismutase das Superoxid inaktiviert (Beckman, 1990). Peroxynitrit kann sowohl protoniert werden und über ein Zwischenprodukt zu toxischen Oxidantien zerfallen, als auch Sulfhydrylgruppen oxidieren und die Lipid-Peroxidation initiieren. Eine Nitrierung von Proteinen erfolgt, wenn Peroxynitrit mit CuZn-, Mn- oder Fe-Superoxid-Dismutase zu einem hochwirksamen Zwischenprodukt reagiert, das deren Proteintyrosin-Überreste nitriert (Ischiropoulos et al., 1992; Beckman, 1996). Eine ausgeweitete Protein-Nitrierung kann im Läsionsmodell 24 bis 72 h nach Reperfusion in den läsionsnahen Gefäßen und dem die Gefäße umgebenden Gewebe gezeigt werden (Coeroli et al., 1998; Bidmon et al., 1998b). Jedoch kommt es nicht nur bei nitrierten Superoxid-Dismutasen zur Proteine, findet Inaktivierung der man auch eine Tyrosinnitrierung der Prostacyclinsynthase, wodurch arteriosklerotische Prozesse gefördert werden (Zou et al., 1999).
- 8. <u>Membranstörungen</u> treten durch die bereits erwähnte Phospholipasen-Aktivierung sowie durch freie Radikale auf; beide führen über die Lipidperoxidation wie auch über die Aktivierung der Cyclooxygenase zur Zerstörung der Zellmembran. Diese Störungen treten bereits innerhalb 1h pl ein, intrazelluläre Organellen und Zytoskelett werden nach 1-3h angegriffen.

 <u>Ödeme</u>, Vergrößerungen des Gewebevolumens durch Schwellungen, werden durch erhöhten Wasser- und Na⁺-Gehalt hervorgerufen. Durch zunehmenden intrakranialen Druck können Ödeme zur Hernienformung des Gehirngewebes führen. Diese tritt bevorzugt am Tentorium auf.

Man kann grundsätzlich drei Typen von Ödemen unterscheiden (Farooqui et al., 1994):

- zelluläre Ödeme	
- vasogene Ödeme	
- hydrocephalische Ödeme	

Zelluläre Ödeme entwickeln sich bereits Sekunden bis Minuten nach dem Gefäßverschluss und sind reversibel, vorausgesetzt die Zirkulation (Reperfusion) wird möglichst bald wiederhergestellt. Bei dieser Art von Ödemen wird die neuronale und gliale Permeabilität für Ionen erhöht, die kapillare Permeabilität hingegen bleibt unverändert. Perivaskuläre und perineuronale Astrozyten-Fortsätze schwellen an, gefolgt vom Anschwellen der Neurone und Endothelzellen. Der extrazelluläre Raum wird verringert, die kapillare Permeabilität bleibt weiterhin unverändert. Von den Neuronen werden überdurchschnittlich hohe Mengen K⁺ in die extrazelluläre Flüssigkeit abgegeben und die Neuronen akkumulieren Wasser und Natriumchlorid (NaCl). Gliazellen übernehmen bei diesem Prozess eine schützende Rolle, da sie große Mengen K⁺ und Na⁺ aufnehmen können. Die Hauptursache für diesen Austausch von K⁺ und Na⁺ ist vermutlich der erschöpfte ATP-Vorrat und der Ausfall des aktiven Transportes. Zelluläre Ödeme beeinflussen sowohl die weiße wie auch graue Substanz.

Vasogene Ödeme entwickeln sich, wenn die Reperfusion verzögert oder nicht ausreichend vorhanden ist. Sie entwickeln sich innerhalb von Stunden bis Tagen nach der ischämischen oder hypoxischen Reaktion und verursachen im Vergleich zu zellulären Ödemen größere Schäden in der weißen wie auch der grauen Substanz. Die Schädigung des Endothels führt zu einer erhöhten kapillaren Permeabilität und öffnet die Bluthirnschranke. Es folgt eine Extravasation großer Proteine sowie von Plasmafiltrat in die extrazellulären Räume, die somit erweitert werden. Diese Art des Ödems kann zu Gefäßkomprimierung, erhöhtem intrakranialen Druck und Hernien des Gehirngewebes führen.

Von den Ödemen bilden zelluläre und vasogene die häufigsten Formen, welche die Ischämie begleiten und wesentlich zur Pathologie des Schlaganfalles beitragen. Gelegentlich kann eine zusätzliche Form, ein *hydrocephalisches Ödem* der Zwischenräume, als Komplikation des Schlaganfalls aufgrund einer Hämorrhagie beobachtet werden. Bei dieser Form liegt eine Störung des Ventrikulär-Systems vor, wodurch zerebrospinale Flüssigkeit in periventrikuläre Bereiche gezwängt wird.

- 10. Veränderungen in Mikrogefäßen treten bereits frühzeitig nach der Ischämie auf, diesen wurde zunächst ein zu geringer Stellenwert zugedacht. So tritt z.B. eine veränderte Vasoregulation auf: das normale Gleichgewicht der Gefäßweite, reguliert durch Vasodilatation (NO und Prostaglandin) und Vasokonstriktion (Endothelin und Thromboxan), wird bei ischämischen Prozessen gestört. NO ruft jedoch nicht allein den positiven Effekt der Vasodilatation hervor, sondern führt über die induzierbare Form iNOS zu einer unerwünschten exzitatorischen Glutamatausschüttung. Weiterhin kommt es zu einer mikrovaskulär vermittelten ischämischen Inflammation, die durch freie Sauerstoff-Radikale und die aktivierten Zytokine ausgelöst wird. Endotheliale-Adhäsions-Rezeptoren werden hochreguliert, was zu einer Ankoppelung von Leukozyten an Endothelzellen mit nachfolgender Transmigration in das perivaskuläre Gewebe führt. Die Phagozytose durch Leukozyten aktiviert die Produktion sowohl toxischer Substanzen wie auch freier Radikale, NO eingeschlossen. Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass es ausschließlich zu einer späten Aktivierung entzündlicher Prozesse kommt, um das Gehirngewebe nach der Läsion von apoptotischen Zellen zu befreien (Leukozyten-Invasion und phagozytotische Aktivität). Hingegen liegt nach heutigem Wissensstand die Vermutung nahe, dass neben später Inflammationen auch frühe Aktivierungen entzündlicher Prozesse existieren, die für den Zelltod von Neuronen und Gliazellen verantwortlich sind.
- 11. Zum Zeitpunkt der Thrombolyse ist die Aktivierung der durch oxidativen Stress bedingten Enzyme bereits angelaufen (Choi, 1993; Floyd and Carney, 1992; Love, 1999). Daher tritt an dieser Stelle der Therapie meist ein weiterer Schadensaspekt hinzu: Bei der durch die Thrombolyse einsetzenden Rezirkulation des ungeschädigten Gewebes wird Sauerstoff vermehrt verfügbar, der in einer ersten Phase auch den aktivierten Enzymen zur Verfügung steht, so dass es in vielen Fällen zu sogenannten <u>Reperfusionsschäden</u> kommen kann, da zytotoxische Radikale im wesentlichen Metaboliten des O₂ sind (Agardh et al., 1991; Patt et al., 1990; van Jaarsveld et al., 1992).

Dabei spielen zwei Stoffwechselmechanismen eine wesentliche Rolle, die zu sehr starken

1. Haber-Weiss-Reaktion;

2. Fenton-Reaktion.

Beide Reaktionen sind Fe²⁺ katalysiert, so dass auch dem Eisenstoffwechsel im geschädigten Gewebe eine bedeutende Rolle zukommt. Eisen kann dabei aus den folgenden drei Komponenten freigesetzt werden: aus hämhaltigen zerstörten Proteinen, aus dem Serum nach Zusammenbruch der Bluthirnschranke und aus einer durch Lactatansäuerung verminderten Eisenbindung an Eisenbindungsproteine. Zudem kann Häm selbst als Prooxidanz wirken (Immenschuh et al., 1999). Hier kommt den Hämoxygenasen eine bedeutende Rolle zu, die sowohl Häm abbauen und dieses zu einem Antioxidanz umwandeln, als auch zusammen mit NO die Expression von zytosolischen und mitochondrialen Eisenbindungsproteinen induzieren.

toxischen Reaktionen führen:

1.2 Schlaganfall im Tiermodell

Die Erforschung therapeutischer Behandlungsmöglichkeiten erfordert ein Tiermodell, das die nachfolgend aufgeführten Erfordernisse möglichst optimal erfüllen kann:

- 1. Die Läsion im Tiermodell sollte mit der Verletzung im menschlichen Gehirn vergleichbar sein.
- 2. Der pathologische Verlauf beim Tier sollte dem des Menschen ähneln.
- 3. Das Modell sollte physiologisch kontrolliert werden, um Parameter, wie z.B. Temperatur, Blutglukose und Blutdruck bei allen Tieren gleich einzustellen.
- 4. Der operative Eingriff sollte bei jedem Tier reproduzierbare Läsionen verursachen und zu gleichen Antworten führen.

Derzeit werden verschiedene Tiermodelle eingesetzt, bei denen sich die Parameter des Schlaganfalls unterschiedlich gut studieren lassen. Grundsätzlich kann zwischen globalen und fokalen ischämischen Tiermodellen unterschieden werden:

- globale Ischämie

- Dekapitation
- Zweigefäß-Verschluss
- Viergefäß-Verschluss

- fokale Ischämie

- MCAO
- Flüssigkeits-Perkussion
- Photothrombose

Beide Modellansätze werden wiederum in permanente Ischämie (ohne Reperfusion) und transiente Ischämie (mit Reperfusion) unterteilt.

Globale Ischämie: Diese Modelle werden eingesetzt, um ischämische Verletzungen nachzuahmen, die aufgrund von Herzstillstand auftreten und das gesamte Gehirn betreffen. Im Modell wird Herzstillstand mittels verschiedener Methoden ausgelöst, so führt z.B. ein Blutaderstau im Nacken, das Abklemmen der proximalen Aorta oder die Erhöhung des intrakranialen Druckes auf überdurchschnittlich hohe Werte zu einer globalen Ischämie. Im Tiermodell der Ratte wird globale Ischämie hauptsächlich durch *Dekapitation* (Nishida et al., 1994; Sager et al., 1995), *Zweigefäβ-Verschluss* (Barone et al., 1994) oder *Viergefäβ-Verschluss* (Nishida et al., 1994; Pulsinelli and Brierley, 1979) ausgelöst.

Einleitung

Fokale Ischämie: Bei diesen Modellen kommt es nur zu einer Teilschädigung des Gehirns, wobei je nach eingesetztem Modell entweder eine gesamte Hemisphäre oder ein Areal primär verletzt wird. Beim Modell der *MCAO* (middle cerebral artery occlusion) wird die fokale Ischämie durch Verschluss der Arteria cerebri media ausgelöst und eine gesamte Hemisphäre primär geschädigt (MCAO, Reinecke et al., 1999; Schroeter et al., 1994). Beim Modell der *Flüssigkeits-Perkussion* (Pierce et al., 1996) wird eine Trepanation vorgenommen und mithilfe einer flüssigkeitsgefüllten Kanüle ein lokal begrenzter Druck auf die Dura und das darunter befindliche Gehirngewebe ausgeübt, wodurch eine Gehirnverletzung mit klinisch relevanten Folgeerscheinungen experimentell nachgebildet wird. Beim Modell der *Photothrombose* (Watson et al., 1985) werden mithilfe einer photosensitiven Substanz (Bengal Rosa) in einem Areal kleine fokale bzw. multifokale Thromben in den kortikalen Endästen der Blutgefäße hervorgerufen.

Da ein Schlaganfall am ehesten der fokalen Ischämie ähnelt, wird der menschliche Schlaganfall auch im Tiermodell besser durch eine fokale, anstatt durch eine globale Ischämie nachgeahmt. Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Arbeit das Modell der Photothrombose gewählt. Der Vorteil dieses Modells im Vergleich zu den anderen fokalen Modellen ist folgender: Während man im Modell der MCAO meist eine ganze Hemisphäre einschließlich der subkortikalen Regionen primär schädigt, kann man im Modell der Photothrombose kleine fokale Läsionen gezielt in bestimmte Areale setzen. Kleine fokale bzw. multifokale Thromben in den kortikalen Endästen treten zwar auch bei der MCAO auf, verteilen sich allerdings ungerichtet. Die Photothrombose bietet außerdem die Möglichkeit, die von der Läsion sekundär über degenerierende Faserbahnen geschädigten Regionen untersuchen zu können. Bei der MCAO hingegen ist das nicht möglich, weil diese Regionen bereits primär lädiert wurden. Im Vergleich zur Flüssigkeits-Perkussion weist die Photothrombose den Vorteil auf, dass eine reproduzierbare Läsion ohne Trepanation und den damit verbundenen weiteren Belastungen möglich ist. Die Verletzung, die aufgrund der fokalen Ischämie im Modell der Photothrombose auftritt, erscheint häufig als Gradient, da Kollaterale die Durchblutung des Gewebes gewährleisten, welches das ischämische Zentrum (Core) umgibt (Abb. 1). Das in das Hindlimb-Areal plazierte Zentrum hat an der Oberfläche des Gewebes einen Durchmesser von ca. 2 mm und durchdringt die Laminae I bis VI, ohne dabei die weiße Substanz direkt zu schädigen. Zwischen Zentrum und angrenzendem Gewebe bildet sich die Demarkationszone aus. Der an diese Demarkationszone angrenzende periläsionale Kortex wird im Grenzbereich zum Läsionszentrum als Rand-Bereich (Rim, Abb. 1) definiert (Bidmon et al., 1998a).



Abb. 1: Graphische Darstellung einer fokalen Ischämie im Modell der Photothrombose. Das von der Läsion betroffene Areal wird abhängig von der Schädigung des Gewebes in Zentrum, Demarkationszone, Rand und periläsionaler Kortex unterteilt. cc=corpus callosum.

1.3 Enzymatische Mechanismen in postischämischen Prozessen

1.3.1 Hämoxygenase-1

Bei den Hämoxygenasen wird zwischen der induzierbaren Hämoxygenase 1 (HO-1), auch als Hitzeschock-Protein 32 (HSP 32) bekannt (Dwyer et al., 1992; Sharp et al., 1999) und der konstitutiv exprimierten Hämoxygenase 2 (HO-2) unterschieden. Während die HO-1 überwiegend in Gliazellen vorkommt, findet man die konstitutiv exprimierte Form (HO-2) in Neuronen und Endothelzellen (Vincent et al., 1994). Die Existenz einer HO-3 ist seit kurzem bekannt, sie wurde jedoch im Gegensatz zur HO-1 und HO-2 noch nicht charakterisiert (McCoubrey et al., 1997). Die HO-1 wird als Hitzeschock-Protein den "immediate early genes" zugezählt und wird sowohl auf Transkriptions- wie auch auf Translationsebene im Gehirn durch eine Vielzahl von Reizen ausgelöst. Dazu zählen Hyperthermie (Hitzeschock), Glutathionabnahme, oxidativer Stress, Ischämie und Hämorrhagien (Blutungen) (Ewing and Maines, 1991, 1993; Geddes et al., 1996; Bergeron et al., 1997; Maines, 1997; Massa et al., 1996; Takizawa et al., 1998; Turner et al., 1999). Für die konstitutive HO-2 ist bisher nur eine effektive Induktion durch adrenale Glukokortikoide bekannt (Weber et al., 1994).

Der Promoter der HO-1 enthält regulative Elemente für Hitzeschock, NFkB, Fos/Jun AP-1, Hypoxie, sowie Faktoren, die auf Häm/Metall reagieren (Ewing et al., 1992; Lavrovsky et al., 1994; Inamdar et al., 1996; Alam et al., 1994). Bei Auftreten solcher Belastungssituationen wird die HO-1 Expression aktiviert und das Gewebe durch diesen endogen protektiv wirkenden Mechanismus geschützt.



Abb. 2: Auswirkung der Hämoxygenase auf den Hämkomplex mit darauf folgender Entstehung der antioxidativen Substanzen Biliverdin und Bilirubin.

Die HO-Proteine regulieren den Stoffumsatz von Häm, sie metabolisieren das Häm-Molekül durch Haftung an der α -meso Carbon-Brücke, welches zu Kohlenmonoxid konvertiert und produzieren das gegen oxidativen Stress neuroprotektiv wirkende offene Tetrapyrol Biliverdin. Dabei wird das chelatierte Eisen (Fe²⁺) frei. Das Biliverdin wird über die Biliverdin-Reduktase weiter zu Bilirubin, einem starken Antioxidant (Maines, 1997), umgewandelt (Abb. 2), welches ebenfalls neuroprotektiv wirkt (Doré et al.,1999; Stocker et al., 1987; Turner et al., 1999). Bilirubin und auch Biliverdin reduzieren darüber hinaus das Recycling von exzitatorischem Glutamat. Ein hohes Niveau an HO Aktivität im Gehirn ist hauptsächlich der HO-2 zuzuschreiben (Trakshel and Maines, 1989; Sun et al., 1990; Verma et al., 1993) und die Kolokalisation ihrer mRNA mit der löslichen Guanylatcyclase (Verma et al., 1993) lässt vermuten, dass das im HO-System generierte Kohlenmonoxid eine potentielle Funktion als Botenstoff im Gehirn hat (Snyder et al., 1998; Zhuo et al., 1993). Da es besonders während ischämischer Prozesse zu oxidativem Stress, Hypoxie, sowie einer erhöhten NFkB-Ausschüttung kommt, ist daher mit einer Expression von HO-1 zu rechnen. Die Hochregulierung von HO-1 während pathologischer Prozesse im Gehirn weist darauf hin, dass HO-1 eine zentrale Rolle im zellulären Verteidigungsmechanismus zukommt (Fukuda et al., 1996).

Außerdem ist bekannt, dass durch Injektion von lysiertem Blut in den Subarachnoidal-Raum eine Hämorrhagie nachgestellt werden kann. Dabei wird über Transkriptionsfaktoren, die auf Häm/Metall reagieren, die HO-1 in Mikroglia induziert (Matz et al., 1996; Turner et al., 1999). So führt z.B. die Induktion der HO-1 zu einer erhöhten Akzeptanz von transplantierten Organen (Willis et al., 1996; Iyer et al., 1998; Woo et al., 1998). Der neuroprotektive Charakter wird auch durch die Ergebnisse an transgenen Mäusen deutlich, die durch Überexpression der HO-1 24 Stunden nach Verschluss der Arteria cerebri media (MCAO) signifikant kleinere Infarkte aufwiesen als Wildtyp Tiere (Panahian et al., 1999).

Zur Rolle von HO-1 während pathologischer Prozesse findet man aber auch Literatur, die dem protektiven Charakter von HO-1 widerspricht. So wurde z.B. berichtet, dass bei Schlaganfällen eine Hemmung der HO-1 durch einen HO-1 Inhibitor neuroprotektiv wirken kann, wenn man diesen innerhalb des therapeutischen Zeitfensters verabreicht (Kadoya et al., 1995). Die gehemmte HO-Aktivität führt vermutlich zu diesem Ergebnis, da durch den Hämund Eisen-Metabolismus nicht nur HO-1, sondern darüber hinaus weitere Gene und somit Enzyme reguliert werden, die dadurch den pathologischen Prozess beeinflussen (Koistinaho et al., 1996).

Zusammenfassung HO-1: - induzierbare Hämoxygenase-1 (HSP32) - hauptsächlich in Glia exprimiert - induziert durch: Hyperthermia Glutathionabnahme oxidativer Stress Hämorrhagie Zerebrale Ischämie - endogener Schutzmechanismus: neuroprotektiv über metabolisierte Antioxidantien

1.3.2 Cyclooxygenase-2

Man unterscheidet zwischen der konstitutiv exprimierten Cyclooxygenase-1 (COX-1, auch als Prostaglandin-Synthase-1 [PGS-1] bekannt) und der durch eine Reihe von Stimuli induzierbaren Cyclooxygenase-2 (COX-2, auch als Prostaglandinsynthase-2 [PGS-2] bekannt), die zu den "immediate early genes" gezählt wird (O'Banion, 1999). Die normalerweise induzierte COX-2 ist in vielen Zelltypen jedoch auch konstitutiv präsent, so z.B. im Gehirn und im Darm, wobei die Funktion des konstitutiv exprimierten Enzyms bislang noch nicht geklärt ist. Die Prostaglandinsynthase-2 wurde zuerst im Sekret der Prostata gefunden. Prostaglandine sind Fettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen (Eicosanoide: eikosi=griechisch, zwanzig) und einem Ring aus fünf C-Atomen. Der erste Schritt der Synthese erfolgt über die Cyclooxygenase, welche Arachidonat (die wichtigste Vorstufe von Eicosanoidhormonen) zu Prostaglandin G (PGG) katalysiert (Abb. 3). Anschließend wird PGG durch gewebe- bzw. zellspezifische Synthasen entweder zu verschiedenen Prostaglandinen (PGE, PGF, PGJ etc.) oder durch Prostacyclinsynthase zu PGI bzw. durch Thromboxansynthase zu Thromboxan metabolisiert.



synthetisiert werden, sowie die der unmittelbar angrenzenden Zellen. Die Art der Effekte kann sich von Zelltyp zu Zelltyp ändern, im Gegensatz zu Hormonen mit gleich bleibender Auswirkung wie z.B. Insulin und Glucagon.

Prostaglandine und Eicosanoide sind parakrine

(lokal wirksame) Hormone. Aufgrund ihrer

Kurzlebigkeit verändern diese Hormone nur

die Aktivität jener Zellen, in denen sie

Abb. 3: Arachidonat ist die wichtigste Vorstufe von Eicosanoiden. Die Cyclooxygenase katalysiert den ersten Schritt bei der Prostaglandin- und Thromboxan-Synthese.

Ausschlaggebende Effekte der Prostaglandine sind die Auslösung von Inflammationen, die Regulation der Blutzirkulation in bestimmten Organen, die Kontrolle des Ionentransportes durch die Zellmembranen hindurch und die Modulation der synaptischen Übertragung.

Der Einsatz von Cyclooxygenase-Inhibitoren veranschaulicht, dass diese Hemmung der Prostaglandin-Synthese analgetisch und antipyretisch wirkt, was für eine Beteiligung der Prostaglandine bei der Modulation der Schmerzempfindung und bei Fieber spricht. Da diese Inhibitoren zudem noch anti-inflammatorisch wirken, scheinen Prostaglandine auch für die Kontrolle von entzündlichen Prozessen mitverantwortlich zu sein (Herschmann, 1996). Eine Hemmung von Entzündungsprozessen kann durch den Cyclooxygenase-Inhibitor Aspirin und andere nicht-steroidale, anti-entzündliche Medikamente (NSAID=non-steroidal anti-inflammatory drugs) erreicht werden. Dabei hemmt die Acetylsalicylsäure die Prostaglandin-Biosynthese durch Acetylierung der endständigen Aminogruppe der Cyclooxygenase (Stryer, 1994). Die selektive Inhibition von COX-2 zur Verminderung von Entzündungsprozessen und Hyperalgesie konnte bereits in mehreren Tiermodellen gezeigt werden (Anderson et al. 1996; Futaki et al., 1993; Masferrer et al., 1994; Seibert et al., 1994; Masaki et al., 1998). Beim Menschen wird die selektive Inhibition der COX-2, z.B. durch MK-0966, bereits zur Behandlung von Osteoarthritis eingesetzt. Dabei wird eine weitaus geringere Schädigung des Gastroduodenums beobachtet als bei Cyclooxygenase-Inhibitoren wie Aspirin bzw. Ibuprofen (Lanza et al., 1999). Auch mit anderen spezifischen COX-2 Inhibitoren, wie z.B. Nimesulide, wurden positive Effekte erzielt. Nimesulide vermindert das Ausmaß der Schädigung der weißen Substanz ohne weitere Nebeneffekte (Wakita et al., 1999). Wenn durch NSAID's keine Unterdrückung der Entzündung erreicht werden kann, sind Glukokortikoid-Hormone die nachfolgend sinnvolle Therapieform. Bereits seit 1988 wird vermutetet, dass man durch Glukokortikoide einen "zweiten Pool" der Prostaglandin-Synthase unterdrücken kann (Raz et al., 1988, 1989; Fu et al., 1990; Han et al. 1990; Masferrer et al. 1990).

Prostaglandine werden in der ipsilateralen Gehirnseite des Traumas freigegeben und sind aufgrund ihrer hyperalgetischen Aktivität für den unmittelbar wirkenden Schmerz und seine Signalwirkung verantwortlich. Dies wurde auch durch eine Arbeit zur transienten MCAO festgestellt: Abhängig von der Reperfusionszeit konnte eine Aktivierung der COX-2 mRNA und ihres Proteins in verschiedenen ipsilateralen Arealen gefunden werden (Planas et al., 1995). Interessanterweise zeigen COX-2 Knock-Out Mäuse normale Infektionsantworten bei mehreren gängigen Tests (O'Banion, 1999). Außerdem ist COX-2 ein die Geschwindigkeit der Prostanoid-Synthese begrenzendes Enzym und kann über das Protein zelluläre Funktionen direkt modifizieren (Kaufmann et al., 1996).

Zusammenfassung

COX-2: - induzierbare Cyclooxygenase-2

- hauptsächlich in Zellkörper von Neuronen exprimiert
- Wirkung von Prostaglandine: Auslösung von Entzündungen Regulation von Blutzirkulation (Fieber) Kontrolle des Ionentransports durch Membranen Modulation der synaptischen Übertragung

1.3.3 Glial-feinfaserig-säurehaltiges-Protein

Das Glial-feinfaserig-säurehaltige-Protein (GFAP) kommt konstitutiv in etwa 15% der Astrozyten vor; Astrozyten wird eine Beteiligung an Reparaturmechanismen im Gehirn zugeschrieben. Eine Zunahme der GFAP Expression und die Bildung einer Gliose sind empfindliche Marker für pathologisch zerebrale Prozesse (O'Callaghan, 1991a). Die sich vermehrenden Astrozyten schwellen an, akkumulieren Glykogen und bilden aufgrund der Filament-Anhäufung einen fibrotischen Zustand. Dieser Zelltyp hat die höchste Resistenz gegen Krankheiten im CNS, nur sehr wenige chronische Krankheiten (so z.B. Alkoholismus) bewirken eine Abnahme von Astrozyten (Siegel, 1993).

Astrozyten besitzen die Fähigkeit, Neurone vor oxidativem Stress zu schützen und haben als Bindeglied zwischen Endothelzellen und Neuronen eine entscheidende Funktion beim Aufbau und der Aufrechterhaltung der Bluthirnschranke. Diese protektive Eigenschaft im Zusammenhang mit oxidativem Stress kommt durch mehrere Faktoren zustande: Astrozyten speichern einen relativ hohen Anteil an Antioxidantien; sie sind für den Transport und Metabolismus von Aminosäuren und Glucose sowie für den Transport von Vitamin C verantwortlich (Wilson, 1997). Darüber hinaus bewirken sie die essentielle Funktion der Glutamataufnahme aus dem extrazellulären Raum, d.h. Astrozyten sind anti-hyperexzitatorisch.

Bei Untersuchungen am Modell der Photothrombose traten GFAP-positive Astrozyten in der Grenzregion des Infarkts innerhalb von 2d pl auf und ihre Anzahl blieb in dieser Region für weitere 10 Wochen konstant. Hingegen erschienen in den läsionsfernen Regionen GFAP-positive Astrozyten erst nach 3d pl und waren bereits nach Ablauf von vierzehn Tagen dort nicht mehr nachweisbar (Schroeter et al., 1995).

Zusammenfassung

GFAP:	- Glial-feinfaserig-säurehaltiges-Protein		
	- konstitutiv in 15% der Astr	rozyten	
	- vermehrt induziert durch T	`rauma	
	- Funktion von Astrozyten:	Blut-Hirn-Schranke	
		Schutz der Neurone vor oxidativem Stre	

SS

1.4 Was ist Vitamin D und wie wirkt es?

1.4.1 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

Vitamin D entsteht unter Lichteinwirkung aus Cholesterin und spielt sowohl im Calcium- wie auch im Phosphatstoffwechsel eine wichtige Rolle. Das Provitamin D₃ (7-Dehydrocholesterin) wird durch ultraviolettes Licht (Wellenlänge 290-315nm) in der Haut zu Prävitamin D₃ photolysiert, das dann spontan zu Vitamin D₃ isomerisiert. Vitamin D₃ (Cholecalciferol) wird durch Hydroxylierungsreaktionen in Leber (C25) und Niere (C1 α) in das aktive Hormon 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol, 1,25 (OH)₂ D₃) umgewandelt (Abb. 4).





Durch Vitamin-D-Mangel in der Kindheit entsteht Rachitis, die durch unvollständige Calcifizierung von Knorpel und Knochen gekennzeichnet ist, falls es an Sonnenlicht mangelt. Auch Nahrungseinflüsse spielen eine Rolle, da die meisten natürlichen Lebensmittel nur einen geringen Gehalt Vitamin-D aufweisen. Fisch-Leberöle bilden eine an Ausnahme, weshalb Lebertran als reiche Vitamin-D-Quelle verwendet wurde. Heute sind angereicherte Lebensmittel verlässliche Vitamin-D-Spender. In den USA wird z.B. einem Liter Milch der empfohlene Tagesbedarf von 400 IE (10µg) zugefügt. Beim Krankheitsbild der Osteomalazie (Erweichung und Labilisierung der Knochen) wird deutlich, dass Erwachsene ebenso wie Kinder auf Vitamin D angewiesen sind. Diese Krankheit findet man häufig bei verhüllten arabischen Beduinenfrauen, deren Haut vom Sonnenlicht kaum erreicht wird. Auch die genetische Anlage spielt im Zusammenhang mit Vitamin D eine Rolle, z.B. die überwiegend genetisch bedingte so wird Osteoporose (Verringerung der Knochenmasse, dadurch Verschlechterung der Knochenstruktur und höhere Anfälligkeit für Knochenbrüche) durch einen Polymorphismus des Vitamin D Rezeptors auf Chromosom 12 verursacht (van Leeuwen et al., 1996).

Zusätzlich zu seinem maßgeblichen Einfluss bei Kalzämie und Knochen-Metabolismus zeigt 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 anti-entzündliche und immunomodulatorische Eigenschaften (Manolagas et al., 1989). Dieses Hormon inhibiert B- und T-Lymphozyten Proliferation (Koren et al., 1989; Manolagas et al., 1989), hemmt die Produktion von IL-2 und IFNy über T-Lymphozyten (Bhalla et al., 1986) und beugt Immunoglobulin Sekretion durch B-Lymphozyten vor (Lemire et al., 1984). In vivo konnten die immunosuppressiven Eigenschaften von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in verschiedenen Tiermodellen der Autoimmun-Thyroiditis und der Diabetes (Fournier et al., 1990; Mathieu et al., 1995) nachgewiesen werden. 1,25 (OH)₂ D₃ steuert die Insulinproduktion und spielt eine bedeutende immunomodulatorische Rolle in Immunkompetenten Zellen (Kadowaki and Norman, 1985; Smith et al., 1990). Auch im ZNS sprechen mehrere Tatsachen dafür, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wichtige regulierende Funktionen erfüllt. Rezeptor-Bindungsstellen des radioaktiv markierten Hormons konnten in bestimmten Neuronen und Mikrogliazellen sowie in nicht-neuronalen Strukturen, z.B. in den perivasculären Organen, gefunden werden (Stumpf und O'Brien, 1987; Bidmon und Stumpf 1992, 1994 und 1996). Außerdem wurde eine Abnahme der Vitamin D Rezeptor Expression bei bestimmten neurologischen Erkrankungen (z.B. Alzheimer) beobachtet (Sutherland et al., 1992).

1,25-Dihydroxyvitamin D_3 verstärkt die Expression des Nerve Growth Factor (NGF) und des Neurotrophin-3 (NT-3) Transkripts in Astrozyten-Kulturen neugeborener Ratten (Neveu et al. 1994a; Neveu et al. 1994b). Weiterhin ist aus Zellkulturen bekannt, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 die Expression neurotropher Faktoren (NT-3, NGF, GDNF), von Zytokinen (TNFa, TGFb, IL-1, IL-2 und IL-8) und Transkriptionsfaktoren (NFkB, c-myc) reguliert.

Außerdem kann 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 durch aktivierte Mikrogliazellen aus seinem Vorläufer 25-Hydroxyvitamin D_3 synthetisiert werden. Dies weist auf die Existenz von "local regulatory loops" hin, welche die Aktion von 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 auf Hirn-Homeostasen kontrollieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 immunomodulatorische Effekte innerhalb des ZNS während eines aktivierten Immunprozesses (Experimentelle-Autoimmun-Encephalomyelitis [EAE]) bei Lewis-Ratten bewirkt (Nataf et al., 1996). Im gleichen Modell bei SJL-Mäusen wurde nachgewiesen, dass die Verabreichung von 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 zeitgleich zur Immunisierung mit Myelin basic Protein (MBP) die Entwicklung von EAE verhindert (Branisteanu et al., 1995; Lemire and Archer, 1990). Sowohl bei den Lewis Ratten wie auch bei den SJL Mäusen konnte eine signifikante Verbesserung durch Senkung der CD4-Antigen Expression gezeigt werden, ausgelöst von durchdringenden Makrophagen und aktivierten Mikrogliazellen in Hirnstamm und Zerebellum.

Zusammenfassung

1,25- Dihydroxyvitamin D₃:

- aktive Form des Hormons Vitamin D₃
- Haut: Lichteinwirkung wandelt 7-Dehydrocholesterin zu Vitamin D
- Leber und Niere: Wandlung zur aktiven Form durch Hydroxilierung
- Eigenschaften: wichtig für Calcium- und Phosphatstoffwechsel passiert frei die Blut-Hirn-Schranke moduliert Expression von: Neurotrophen Faktoren Zytokinen
 - Transkriptionsfaktoren

1.4.2 Protektion durch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

Deutliche protektive Effekte durch Vitamin D sind bei Multipler Sklerose (MS) beschrieben worden (Hayes et al., 1997), während die funktionelle Integration der histologischen in vitro Befunde der Vitamin D regulierten Prozesse noch weiter geklärt werden muss.

Bei der Betrachtung der geographischen Verteilung der Autoimmun-Erkrankung MS wird erneut der Einfluss des Umweltfaktors Sonnenlicht deutlich, die Verbreitung von MS nimmt mit steigender Entfernung vom Äquator drastisch zu. Außerdem sind zwei eigentümliche geographische Anomalien bekannt: zum einen in der Schweiz mit vielen MS-Erkrankungen im Tälern und geringen im Gebirge, zum anderen in Norwegen mit vielen MS-Erkrankungen im Landesinneren und nur wenigen entlang der Küste. Die Anomalie in der Schweiz kann durch erhöhte Vitamin D₃ Synthese aufgrund des intensiven Ultravioletteinflusses im Gebirge, die in Norwegen durch einen erhöhten Fisch-Konsum an der Küste erklärt werden. Dazu konnte in Arbeiten mit der Experimentellen-Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) bei Nagern, einem weit akzeptierten Modell für die menschliche MS, gezeigt werden, dass exogenes 1,25 (OH)₂ D₃ die EAE vollständig verhindern kann (Lemire und Archer, 1991; Branisteanu et al., 1995; Cantorna et al., 1996).

Bei Entzündungsprozessen im Gehirn, wie z.B. virale Infektionen oder EAE, ist das iNOS Gen hochreguliert. Die dadurch erhöhte NO-Produktion könnte in einem gewissen Ausmaß für Veränderungen der CNS-Funktionen bzw. CNS-Gewebezerstörungen in EAE-Ratten verantwortlich sein (Koprowski et al., 1993). In vitro Studien deuten darauf hin, dass von Gliazellen gebildetes NO den Tod von Oligodendrozyten und somit die Demyelinisierung verursacht, so dass NO an der Bildung von Läsionen während der MS vermutlich beteiligt ist (Bagasra et al. 1995). Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass humane iNOS mRNA in demyelinisierten Regionen des Gehirns von MS-Patienten gegenüber Kontroll-Gehirnen deutlich erhöht ist (Bö et al., 1994). Im Hinblick auf die potentielle Rolle von NO ist die Regulierung der iNOS Expression in der Pathogenese des ZNS von großem Interesse. Lipopolysaccharide (LPS) und IFNy lösen sowohl alleine wie auch in Kombination mit TNFa oder IL1ß eine Expression von iNOS in Makrophagen, Astrozyten und Mikrogliazellen aus (Szabo and Thiemermann, 1995). Im Gegensatz dazu konnte für die anti-entzündlich wirkenden Zytokine, wie Interleukin-4 (IL4), IL-10, IL13 und TGFB, gezeigt werden, dass sie die iNOS Induktion verhindern bzw. der NO Zytotoxizität entgegen wirken (Ding et al., 1990). Glucocorticoide und Retinsäure (Vitamin A) zeigten in vitro ebenso eine antagonistische Wirkung auf die iNOS Synthese in verschiedenen Zelltypen (Di Rosa et al., 1990; Simmons and Murphy, 1993; Hirokawa et al., 1994). Allerdings ist die Rolle von Retinsäure noch unklar, da auch durch iNOS induzierbare Effekte in einigen Zellkulturen beschrieben wurden. 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 hat eine starke immunosuppressive Wirkung, wobei diese oft über Regulierung von iNOS, speziell in ZNS-Zellen abläuft. Dabei scheint die Suppression der glialen iNOS Expression eine Rolle zu spielen. Allerdings ist auch hier noch unklar, ob diese Wirkung direkt über 1,25 (OH)₂ D₃ erfolgt, da Hormon-Response-Elemente auf dem iNOS-Gen bislang nicht beschrieben wurden, so dass die Wirkung auch über 1,25 (OH)₂ D₃ regulierte Zytokine oder neurotrophe Faktoren erfolgen könnte.

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bindet an den intrazellulären Vitamin D Rezeptor (VDR) und agiert als ein ligandabhängiger Transkriptionsfaktor (Green and Chambon, 1988). Der VDR gehört zur Steroid-Thyroid-Hormon-Rezeptor Superfamilie, eine Gruppe von Multigenfamilien und "Single copy-Genen", die durch ihre Sequenz zusammengehören und einen gemeinsamen Vorläufer, jedoch unterschiedliche Funktionen haben. Vitamin D ist ein Membran-Antioxidant und könnte über die nachgewiesene Regulation der Expression von γ -Glutanyltranspeptidase, einem Enzym des Glutathionmetabolismus, auch in vivo den oxidativen Stress vermindern. Glutathion stellt nämlich als Substrat der H₂O₂ entgifteten Glutathionperoxidase einen essentiellen Bestandteil endogener Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress dar (Garcion et al., 1996, 1999).

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine systematisch quantitative Analyse der Verteilungsmuster verschiedener Proteine im Modell des Schlaganfalls bei der Ratte untersucht. Ziel war, den Effekt der aktiven Form des Hormons 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ auf die laminäre und regionale Verteilung von HO-1, COX-2 und GFAP im Kortex nach der Läsion mithilfe der Immunhistochemie darzustellen. Dazu wurden die aufgeführten immunhistochemischen Färbungen sowohl bei Kontrolltieren ohne Infarkt wie auch bei photothrombotisch infarzierten Tieren mit bzw. ohne Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu verschiedenen Zeiten pl verglichen.

Der Schlaganfall ist eine häufig auftretende und experimentell gut untersuchte Erkrankung, jedoch findet man in der Vielzahl der Studien nur selten Arbeiten, die nach Gabe eines Medikamentes die Auswirkung auf Verteilungsmuster verschiedener Enzyme zu unterschiedlichen Zeiten pl untersuchen.

Des Weiteren wurden die HO-1 positiven Zellen mittels der Fluoreszenz-Doppelmarkierung in den verschiedenen Gliazelltypen qualitativ nachgewiesen.

Da der protektive Charakter von 1,25 (OH)₂ D_3 aus dem Tiermodell der Multiplen Sklerose bekannt ist (Garcion et al., 1997), sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung der aktiven Form des Hormons in einer *in vivo* Studie untersucht werden, um einen evtl. nutzbringenden Effekt auf das die Läsion umgebende Gewebe und die umliegenden Regionen nachweisen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Der polyklonale Hämoxygenase-1 Antikörper (Rabbit) wurde von der Fa. StressGen (OSA-100, Victoria, Canada) bezogen; als Immunogen wurde aufgereinigte Ratten-Leber HO-1 genutzt. Der Antikörper bindet spezifisch an die HO-1, einem 32 kDa Protein (HSP32). Bei dem monoklonalen Antikörper gegen GFAP (anti-glial fibrillary acidic protein, Immunglobulin-Klasse IgG1) handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper aus Maus-Maus Hybridzellen der Fa. Boehringer (Mannheim). Mit diesem Antikörper, bei dem als Immunogen gereinigtes Gliafilament verwendet wurde, werden Astrozyten und Bergmann-Gliazellen angefärbt. Ebenfalls wurde von der Firma Boehringer (Mannheim) ein MAG-Antikörper bezogen, ein monoklonaler Antikörper gegen Myelinassoziertes Glykoprotein, welches zum Nachweis von Oligodendrozyten eingesetzt werden kann. Von der Firma Serotec wurde der monoklonale OX-42 Antikörper bezogen. Die Firma Aldrich Chemie in Steinheim lieferte die photosensitive Substanz Bengal Rosa; das 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wurde von der Fa. Schering zur Verfügung gestellt (ZK 131 666, Ch. Nr. WSP 94 H22B). Das Normal Donkey Serum (NDS), Normal Goat Serum (NGS), Normal Horse Serum (NHS) und der Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Kit) stammte von der Fa. Vector Laboratories (Burlingame, USA). Von der Fa. Sigma (St.Louis, MO; USA) erhielten wir folgende Chemikalien: Erdnussöl, Triton X-100 und Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB). Isopentan und "DPX Mountant for histology" stammten von der Fa. Fluka (Buchs), von der Fa. Paesel und Lorei (Frankfurt). Die Substanz Tris (hydroxymethyl) aminoethan, p.a., Tissue Freezing Medium von der Fa. Jung (Nussloch). Menzel-Gläser (Braunschweig) lieferte Deckgläser und Objektträger, die Fa. Dahlhausen (Köln) 20 ml Einmalspritzen, die Fa. Becton und Dickinson (Dublin, Irland) sterile Kanülen, die Fa. Abbott (Wiesbaden) das Anästhetikum Enfluran. Die nachfolgend aufgeführten Chemikalien lieferte die Fa. Merck (Darmstadt): Paraformaldehyd (PFA), Natriumchlorid (NaCl), Chrom-(III)-Kaliumsulfat, Saccharose, Xylol, Pikrinsäure, Wasserstoffperoxid, Gelatine, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumhydrogenphosphat, Polyethylenglycol 200 und Pentobarbital.

Die Gefrierschnitte wurden mit dem Frigomobil Hn 40 der Fa. Reichert-Jung hergestellt, die Fotografien wurden sowohl mithilfe des Photomakroskops M400 der Fa. Wild und mit dem Axiophot der Fa. ZEISS angefertigt.

2.2 Die Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden 69 männliche Wistar-Ratten in der Gewichtsklasse zwischen 280-380g (durchschnittlich 301,95g +/- 30,64g) untersucht. Alle Tiere stammten aus der Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, wo sie in Standardkäfigen bei gleichbleibender Temperatur 22°C +/- 2°C, 55%-iger +/- 5% Luft-feuchtigkeit und einem 12 Stunden Tag-/Nachtrhythmus untergebracht waren. Den Tieren wurde Futter der Fa. Altromin (Lage) und außerdem Wasser ad libitum angeboten.

Gruppen	Status	Injektion i.p).	Perfusion
Gruppe 1	Infarkt	1,25 (OH) ₂ D ₃	1h pl	12h pl
Gruppe 2	Infarkt	1,25 (OH) ₂ D ₃	1h pl	1d pl
Gruppe 3	Infarkt	1,25 (OH) ₂ D ₃	1h pl	2d pl
Gruppe 4	Infarkt	1,25 (OH) ₂ D ₃	12h pl	2d pl
Gruppe 5	Infarkt	1,25 (OH) ₂ D ₃	1h und 48h pl	5d pl
Gruppe 6	Infarkt	E-Öl	1h pl	12h pl
Gruppe 7	Infarkt	E-Öl	1h pl	1d pl
Gruppe 8	Infarkt	E-Öl	1h pl	2d pl
Gruppe 9	Infarkt	E-Öl	12h pl	2d pl
Gruppe 10	Infarkt	E-Öl	1h und 48h pl	5d pl
Gruppe 11	Kontrolle o.I.	-	-	direkt
Gruppe 12	Kontrolle o.I.	1,25 (OH) ₂ D ₃	direkt	36h p Injektion
Gruppe 13	Kontrolle o.I.	E-Öl	direkt	36h p Injektion

Die Untersuchung der Tiere erfolgte nach folgender Gruppenaufteilung:

Tab. 2: Untersuchte Gruppen: 1-10 jeweils n=6 Tiere und 11-13 je n=3 Tiere.

1,25 (OH)₂ D₃=1,25 Dihydroxyvitamin D₃, E-Öl=Erdnuss-Öl.

Die kortikale Photothrombose wurde durch Anwendung der Bengal Rosa-Technik induziert (Watson et al., 1985). Zur Narkose erhielten die Tiere mittels einer dicht schließenden Gesichtsmaske anfänglich 3,5% Enfluran und nachfolgend 2% bis 2,5% Enfluran in einem Gemisch von 1:2 O_2/N_2 . Ein Katheder wurde in die Femoral-Vene der Leistengegend eingeführt, um eine spätere intravenöse Verabreichung der photosensitiven Substanz Bengal Rosa zu ermöglichen. Das Tier wurde anschließend in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt, die Kopfhaut aufgeschnitten, ein Punkt im Repräsentationsareal des Hinterfußes der rechten Hemisphäre anhand der Bregma-Lambda-Koordinaten ausfindig gemacht und ein Glasfaserbündel auf den ermittelten Belichtungspunkt der Schädeldecke positioniert. Dieser Belichtungspunkt wurde durch Halbierung der Strecke Bregma–Lambda \cong 3,5 – 4 mm, d.h. 3,5 – 4 mm posterior und 4 mm lateral zur *Sutura sagittalis* lokalisiert (Abb. 5).



Abb.5: Dorsale und laterale Ansicht des Rattenschädels mit den Positionen von Bregma, Lambda und Interaural Linie. (nach Paxinos und Watson, 1982).

Nach der intravenösen Injektion von 0,4 ml der stark photosensitiven Bengal Rosa-Lösung (10 mg/ml in sterilen 0,9% NaCl, optimale Photoaktivierung bei Wellenlänge von 540 nm) wurde die Kaltlichtquelle (Schott KL 1500, Mainz) mittels eines optischen Glasfaserbündels positioniert und zur 20-minütigen Belichtung eingeschaltet. Die Körpertemperatur des Tieres wurde durchgehend kontrolliert und gegebenenfalls reguliert (36,8-37,2°C; temp<36,8°C: Abdeckung; temp>37,2°C Alkohol auf Schwanz), da sie einen Einfluss auf die Infarktgröße haben kann (Abb. 6). Nach der Belichtung wurden sowohl Kopfhaut wie auch Leistengegend vernäht und die Operation durch Gabe von reinem Sauerstoff ausgeleitet. Alle Infarkttiere erhielten 1h, 12h bzw. 1h und 48h post Läsion (pl) intraperitoneal (i.p.) entweder 4 μ g 1,25 (OH)₂ D₃/kg Körpergewicht gelöst in Erdnussöl oder die gleiche Menge reines E-Öl (Tab. 2).



Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für den Schritt der Belichtung. Nach dem operativen Einführung Eingriff zur des Katheders in die Femoral-Vene wurde die Ratte im Stereotakten fixiert und die Kaltlichtquelle über das Repräsentationsareal der hinteren Extremität positioniert.

2.2.1 Präparation der Gehirne

Die Tiere wurden abhängig von den Gruppen zu verschiedenen Zeiten pl (Tab. 2) mit jeweils 50 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital narkotisiert und dann perfundiert. Nach Öffnung des Thorax erfolgte eine transkardiale Perfusion. Dazu wurde das Herz durch Spalten des Herzbeutels bis zum Abgang der Aorta ascendens freigelegt. Der linke Ventrikel wurde an der Herzspitze geöffnet und die mit 0,9% NaCl gefüllte Kanüle in die Aorta ascendens eingeführt und festgeklemmt. Das rechte Herzohr wurde angeschnitten, um das Gefäßsystem mit ca. 80 ml Vorspüllösung blutleer spülen zu können. Die Fixierung erfolgte mit ca. 450 ml Zamboni (Romeis 1989), dabei diente die Verfärbung der nicht pigmentierten Nasen, Augen und Pfoten als Kontrolle zur Erfassung des gesamten Blutgefäßsystems.

Die Dekapitation durchtrennte die Medulla spinalis, anschließend wurde die Kopfhaut durch einen Schnitt von occipital nach frontal eingeschnitten und die freigelegte Schädeldecke durch zwei laterale Schnitte bis zum Bulbus olfactorius geöffnet. Dadurch konnte die Schädeldecke entfernt werden, ohne das Gehirn zu verletzen. Bei den Infarkttieren wurde die Läsion mit einem Durchmesser von ca. 2 mm in der rechten Hemisphäre im Hinterfußareal sichtbar. Das Gehirn wurde mithilfe eines Spatels entnommen und für zwei Tage bei 4°C in Zamboni nachfixiert. Danach wurde es bis zur Gewebesättigung in 25% iger Saccharoselösung bei 4°C belassen. Das durch die Saccharoselösung vor Gefrierschäden geschützte Gewebe wurde in Isopentan bei –40 bis –30°C für 5 min eingefroren, um anschließend am Kryotom geschnitten zu werden.

Puffer:

0,2 M PB, pH7,4:	800 ml Aqua dest42,9 g Na2HPO4300 ml Aqua dest8,3 g NaH2PO4diesen Puffer in den ersten geben bis pH7,4 erreicht	
10xPBS, pH7,4 (1xPBS=0,01	M): 0,1 M PB, 9% (w/v) NaCl z.B.: 1 l: 500 ml 0,2 M PB 90 g NaCl ad 1 l mit Aqua dest, pH-Wert kontrollieren, evtl. regulieren	
Pentobarbitallösung:	1 g Pentobarbital/10 ml 9 ml steriles Aqua dest 1 ml Polyethylenglycol 200	
Vorspüllösung:	0,9% (w/v) NaCl in Aqua dest 0,5 ml/500 ml Liquimin	
Zamboni:	4% (w/v) Paraformaldehyd 15% (v/v) gesättigte Pikrinsäure-Lösung 0,1 M PB	
Saccharoselösung:	25% (w/v) Saccharose in 0,01 M PBS	

2.2.2 Histologische Präparation

Die Erstellung lückenloser Frontalschnittserien mit einer Schnittdicke von 70 µm erfolgte am Gefriermikrotom bei -16 bis -20°C Objektkühlung mit einem ungekühlten Messer. Die gefrorenen Gehirne wurden mit Tissue Freezing Medium, das bei Temperaturen unter 0°C langsam aushärtet, mit dem Kleinhirn zuunterst auf dem Objekttisch fixiert und in frontaler Orientierung im Bereich der Läsion komplett durchgeschnitten. Die Schnitte wurden mithilfe eines Pinsels alternierend in Rollrandgläschen mit 0,01 M PBS überführt und in diesen bis zur weiteren Behandlung (flottierende Färbungen, falls längere Lagerung mit 0,1% (w/v) NaN₃) bei 4°C gelagert.

2.3 Immunhistochemische Färbungen

Zum immunhistochemischen Nachweis veränderter Verteilungen der interessierenden Substanzen im Gehirn wurden folgende Antikörper eingesetzt:

- HO-1, polyklonal IgG Kaninchen, StressGen
- COX-2, monoklonal IgG Maus, Dianova
- GFAP, monoklonal IgG Maus, Boehringer

Die Färbungsansätze wurden pro Färbung und Tier an jeweils 6-8 alternierenden Schnitten aus verschiedenen Bereichen des Infarktes durchgeführt. Die zugehörigen Methoden der verschiedenen immunhistochemischen Färbungen werden auf den folgenden Seiten dargestellt.

Um die Auswertung unspezifischer Färbungen auszuschließen, wurde zur Kontrolle der Erst-Antikörper die "Auslassungsmethode" verwandt. Dabei wird die Färbung unter Auslassung des 1.Antikörpers durchgeführt. Nach der Entwicklung erscheint dadurch die unspezifische Färbung, die durch den 2.Antikörper hervorgerufen wird (Abb. 48 bis 50). Diese Kontrollfärbungen wurden zu jedem Ansatz angefertigt. Eine ausschließliche Kontrollreaktion mit dem Avidin-Biotin-Komplex (ABC, Kontrolle der Verstärkung von endogenem Biotin) und der nachfolgenden Entwicklung mit DAB wurde hingegen nur einmalig durchgeführt und ergab ungefärbte Schnitte, wie auch bei der Entwicklung mit DAB.

2.3.1 HO-1 Antikörperfärbung

Zur HO-1-Färbung wurden die in PBS gelagerten Schnittserien wie folgt weiterbehandelt:

- 3 mal je 10 min in 0,01 M PBS, pH 7,4 unter leichtem Schütteln waschen
- 1 mal 30 min in 0,01 M PBS mit 1% (v/v) H₂O₂ endogene Peroxidase inhibieren
- 2 mal 10 min in 0,01 M PBS, pH 7,4 waschen
- 1 mal 10 min in 0,05 M TBS, pH 7,4 waschen
- 1 mal 10 min in 0,05 M TBS, pH 7,4 mit 0,1% (v/v) Triton X 100 (Triton) waschen
- 1 mal 30 min in 0,05 M TBS mit 10% (v/v) NGS inkubieren
- Inkubation f
 ür 36 bis 48 h bei 4°C in 0,05 M TBS mit 0,1% (v/v) Triton und dem poly-klonalen HO-1 Antik
 örper in einer 1:700 Verd
 ünnung
- 1 mal 30 min Schnitte auf Raumtemperatur anwärmen
- 4 mal 10 min in 0,05 M TBS waschen
- Inkubation f
 ür 24 h bei 4°C in 0,05 M TBS und einem biotinylierten Anti-Kaninchen Antikörper in einer Verd
 ünnung 1: 100
- 3 mal 15 min in 0,05 M TBS spülen
- parallel: nach dem ersten Spülgang ABC-Lösung ansetzen:
 - halbes Endvolumen an 0,05 M TBS vorlegen
 - Lösung A und B bis zur Endverdünnung von je 1:300 dazugeben
 - nach 30 min zweite Hälfte an 0,05 M TBS hinzufügen
- Inkubation in ABC-Lösung für 1,5 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
- 2 mal 10 min in 0,05 M TBS waschen
- 2 mal 10 min in 0,05 M TB, pH 7,6 waschen
- Entwicklungslösung: 1 ml DAB (5 mg/ml) auf 10 ml TB
 - kurz vor Gebrauch: 10µl 1%-iges H₂O₂/ml DAB-Lösung
- Inkubation der Schnitte für 10 bis 60 min in DAB-Lösung, Kontrolle im Mikroskop
- Abstoppen der Reaktion mit 0,05 M TB
- Aufbewahrung der Schnitte in 0,05 M TB-Puffer bei 4°C bzw.:
- direktes Aufziehen der Schnitte mit Chromalaungelatine auf Objektträger
- Trocknen der Schnitte
- Einstellen der Schnitte für 10min in Xylol
- Eindeckeln der Schnitte mit DPX

2.3.2 COX-2 Antikörperfärbung

Zur COX-2 Färbung wurden die in PBS gelagerten Schnittserien wie folgt weiterbehandelt:

- 3 mal je 10 min in 0,01 M PBS, pH 7,4 unter leichtem Schütteln waschen
- 1 mal 30 min in 0,01 M PBS mit 1% (v/v) H_2O_2 endogene Peroxidase inhibieren
- 2 mal 10 min in 0,01 M PBS, pH 7,4 waschen
- 1 mal 10 min in 0,05 M TBS, pH 7,4 waschen
- 1 mal 10 min in 0,05 M TBS, pH 7,4 mit 0,1% (v/v) Triton X 100 (Triton) waschen
- 1 mal 30 min in 10% (v/v) NHS in 0,05 M TBS mit 0,1% (v/v) Triton inkubieren
- Inkubation für 36 bis 48 h bei 4°C in 0,05 M TBS mit 0,1% (v/v) Triton und dem mono-klonalen COX-2 Antikörper in einer 1:250 Verdünnung
- 1 mal 30 min Schnitte auf Raumtemperatur anwärmen
- 4 mal 10 min in 0,05 M TBS waschen
- Inkubation für 24 h bei 4°C in 0,05 M TBS und einem biotinylierten Maus-Antikörper (rat adsorped) in einer Verdünnung 1: 100
- 3 mal 15 min in 0,05 M TBS spülen
- parallel: nach dem ersten Spülgang ABC-Lösung ansetzen:
 - halbes Endvolumen an 0,05 M TBS vorlegen,
 - Lösung A und B bis zur Endverdünnung von je 1:300 dazugeben
 - nach 30 min zweite Hälfte an 0,05 M TBS hinzufügen
- Inkubation in ABC-Lösung für 1,5 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
- 2 mal 10 min in 0,05 M TBS waschen
- 2 mal 10 min in 0,05 M TB, pH 7,6 waschen
- Entwicklungslösung: 1 ml DAB-Lösung (5 mg/ml) auf 10 ml TB
 - kurz vor Gebrauch: 10µl 1%-iges H₂O₂/ml DAB-Entwicklungslösung
- Inkubation der Schnitte in DAB-Lösung für 10 bis 60 min, Kontrolle im Mikroskop
- Abstoppen der Reaktion mit 0,05 M TB
- Aufbewahrung der Schnitte in 0,05 M TB-Puffer bei 4°C bzw.:
- direktes Aufziehen der Schnitte mit Chromalaungelatine auf Objektträger
- Trocknen der Schnitte
- Einstellen der Schnitte für 10min in Xylol
- Eindeckeln der Schnitte mit DPX

2.3.3 GFAP Antikörperfärbung

Zur GFAP Färbung wurden die in PBS gelagerten Schnittserien wie folgt weiterbehandelt:

- 3 mal je 10 min in 0,01 M PBS, pH 7,4 unter leichtem Schütteln waschen
- 1 mal 30 min in 0,01 M PBS mit 1% (v/v) H_2O_2 endogene Peroxidase inhibieren
- 2 mal 10 min in 0,01 M PBS, pH 7,4 waschen
- 2 mal 10 min in 0,05 M TBS, pH 7,4 waschen
- 1 mal 30 min in 0,05 M TBS mit 2% (v/v) NGS inkubieren
- Inkubation für 36 bis 48 h bei 4°C in 0,05 M TBS mit 0,2% (v/v) Triton X 100 (Triton) und dem monoklonalen GFAP Antikörper in einer 1:25 Verdünnung
- 1 mal 30 min Schnitte auf Raumtemperatur anwärmen
- 4 mal 10 min in 0,05 M TBS waschen
- Inkubation f
 ür 24 h bei 4°C in 0,05 M TBS und einem Peroxidase konjugierten Anti-Maus Antik
 örper in einer Verd
 ünnung von 1: 50
- 3 mal 15 min in 0,05 M TBS spülen
- 2 mal 10 min in 0,05 M TB, pH 7,6 waschen
- Entwicklungslösung: 1 ml DAB (5 mg/ml) auf 10 ml TB

- kurz vor Gebrauch: 10µl 1%-iges H2O2/ml DAB-Lösung

- Inkubation der Schnitte in DAB-Lösung für 10 bis 60 min, Kontrolle im Mikroskop
- Abstoppen der Reaktion mit 0,05 M TB
- Aufbewahrung der Schnitte in 0,05 M TB-Puffer bei 4°C bzw.:
- direktes Aufziehen der Schnitte mit Chromalaungelatine auf Objektträger
- Trocknen der Schnitte
- Einstellen der Schnitte für 10min in Xylol
- Eindeckeln der Schnitte mit DPX
2.4 Kolokalisation mittels Doppelimmunfluoreszenz

Die Bestimmung der verschiedenen Zelltypen und ihr Anteil an den HO-1 positiv gefärbten Zellen erfolgte nicht allein aufgrund ihrer Morphologie, sondern wurde mittels Fluoreszenz-Doppelmarkierungen bestätigt. Zum Nachweis von HO-1 positiver Astrozyten wurde die Doppelmarkierung mit dem Astrozytenmarker GFAP (Glial fibrilläres saures Protein) gewählt. HO-1 positive Mikrogliazellen wurden mithilfe des OX-42 Antikörpers (auf das Oberflächen-Adhäsions-Molekül CD11b reagierend) dargestellt. Außerdem konnte mithilfe des MAG-Antikörpers (Myelin-assoziertes Glykoprotein) gezeigt werden, dass es sich bei den kugelförmigen HO-1 positiven Zellen tatsächlich um Oligodendrozyten handelt.

Die Ansätze wurden pro Färbung und Gruppe an jeweils 4-6 alternierenden Schnitten aus verschiedenen Bereichen des Infarktes durchgeführt. Die zugehörigen Methoden der verschiedenen Fluoreszenz-Färbungen werden auf den folgenden Seiten dargestellt.

Um die Auswertung unspezifischer Färbungen bei der Fluoreszenz Färbung auszuschließen, wurde zur Kontrolle der Erst-Antikörper ebenfalls die "Auslassungsmethode" verwandt. Dabei wird die Färbung unter Auslassung des 1.Antikörpers durchgeführt. Dadurch erscheint die mögliche unspezifische Färbung, die durch den Fluoreszenz-Antikörper (dem Zweit-Antikörper) hervorgerufen wird.

2.4.1 HO-1 und GFAP

Für die Fluoreszenz-Färbung (HO-1 + GFAP) wurden die Schnitte wie folgt weiterbehandelt:

- 3 mal je 10 min in 0,01 M PBS, pH 7,4 unter leichtem Schütteln waschen
- 2 mal 10 min in 0,05 M TBS, pH 7,4 waschen
- 30 min in 0,05 M TBS mit 0,1% Triton X 100 (Triton) mit 10% NGS und 2% NDS waschen
- Inkubation f
 ür 36 bis 48 h bei 4°C in 0,05 M TBS mit 0,1% Triton und dem polyklonalen HO-1 Antikörper in einer Verd
 ünnung von 1:300 und dem monoklonalen GFAP Antikörper in einer Verd
 ünnung von 1:25
- 4 mal 10 min in 0,05 M TBS waschen
- 1 mal 10 min in 0,05 M TBS mit 0,1% Triton waschen
- Inkubation für 24 h bei 4°C in 0,05M TBS mit 0,1% Triton und Cy3 Anti-Kaninchen aus Esel (Verdünnung 1:200) und DTAF Anti-Maus Antikörper aus Ziege (Verdünnung 1:100)
- 3 mal 15 min in 0,05 M TBS mit 0,2% Triton spülen
- 2 mal 10 min in 0,05 M TB, pH 7,6 waschen
- direktes Aufziehen der Schnitte in TB auf Objektträger
- Eindeckeln der Schnitte mit Vectashield-Einbettmedium

2.4.2 HO-1 und OX-42

Für die Fluoreszenz-Färbung (HO-1 + OX-42) wurden die Schnitte wie folgt weiterbehandelt:

- 3 mal je 10 min in 0,01 M PBS, pH 7,4 unter leichtem Schütteln waschen
- 2 mal 10 min in 0,05 M TBS, pH 7,4 waschen
- 30 min in 0,05 M TBS mit 0,1% Triton mit 10% NGS und 2% NDS waschen
- Inkubation f
 ür 36 bis 48 h bei 4°C in 0,05 M TBS mit 0,1% Triton und dem polyklonalen HO-1 Antikörper in einer Verd
 ünnung von 1:300 und dem monoklonalen OX-42 Antikörper in einer Verd
 ünnung von 1:50
- 4 mal 10 min in 0,05 M TBS waschen
- 1 mal 10 min in 0,05 M TBS mit 0,1% Triton waschen
- Inkubation für 24 h bei 4°C in 0,05 M TBS mit 0,1% Triton und Cy3 Anti-Kaninchen aus Esel (Verdünnung 1:200) und DTAF Anti-Maus Antikörper aus Ziege (Verdünnung 1:100)
- 3 mal 15 min in 0,05 M TBS mit 0,2% Triton spülen
- 2 mal 10 min in 0,05 M TB, pH 7,6 waschen
- direktes Aufziehen der Schnitte in TB auf Objektträger
- Eindeckeln der Schnitte mit Vectashield-Einbettmedium

2.4.3 HO-1 und MAG

Für die Fluoreszenz-Färbung (HO-1 + MAG) wurden die Schnitte wie folgt weiter behandelt:

- 3 mal je 10 min in 0,01 M PBS, pH 7,4 unter leichtem Schütteln waschen
- 2 mal 10 min in 0,05 M TBS, pH 7,4 waschen
- 30 min in 0,05 M TBS mit 0,1% Triton mit 10% NGS waschen
- Inkubation f
 ür 36 bis 48 h bei 4°C in 0,05 M TBS mit 0,2% Triton und dem polyklonalen HO-1 Antikörper in einer Verd
 ünnung von 1:300 und dem monoklonalen MAG Antikörper in einer Verd
 ünnung von 1:50
- 4 mal 10 min in 0,05 M TBS waschen
- 1 mal 10 min in 0,05 M TBS mit 0,1% Triton waschen
- Inkubation für 24 h bei 4°C in 0,05 M TBS mit 0,1% Triton und DTAF Anti-Kaninchen aus Ziege (Verdünnung 1:100) und Cy3 Anti-Maus Antikörper aus Ziege (Verdünnung 1:200)
- 3 mal 15 min in 0,05 M TBS mit 0,2% Triton spülen
- 2 mal 10 min in 0,05 M TB, pH 7,6 waschen
- direktes Aufziehen der Schnitte in TB auf Objektträger
- Eindeckeln der Schnitte mit Vectashield-Einbettmedium

Für alle Färbungen gelten folgende Pufferprotokolle:

0,2 M PB, pH 7,4:	800 ml Aqua dest 42,9 g Na_2HPO_4	
	$300 \text{ ml Aqua dest} \qquad 8,3 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4$	
	NaH ₂ PO ₄ -Puffer in den Na ₂ HPO ₄ -Puffer geben, bis ein pH-Wert	
	von 7,4 erreicht wird (bei ca. 1 l, restlicher Puffer wird entsorgt)	
0,1 M PBS (10x), pH 7,4:	0,1 M PB	
	9% NaCl (w/v) z.B.: 11: 500 ml 0,2 M PB	
	90 g NaCl	
	ad 1 l mit Aqua dest, pH-Wert kontrollieren und evtl. regulieren,	
	kann bei Raumtemperatur gelagert werden. Gebrauchslösung	
	(0,01 M PB + 0,9% (w/v) NaCl): Stocklösung 1:10 verdünnen	
	und pH-Wert erneut kontrollieren.	
0,05 M TBS, pH 7,4:	500 ml Aqua dest 3,79 g TRIZMA Pre-set crystals, pH 7,4	
	4,5 g NaCl (0,9%)	
	pH-Wert kontrollieren	
0,05 M TB, pH 7,6:	500 ml Aqua dest 3,725 g TRIZMA Pre-set crystals, pH 7,6	
	pH-Wert kontrollieren	
Chromalaungelatine:	0,5% (w/v) Gelatine	
	0,1% (w/v) Chromalaun in A.dest	
	Die Substanzen in Aqua dest geben und auf 60°C erhitzen, um	
	die Gelatine aufzulösen; bei 4°C lagern.	

2.5 Methodik der Auswertung

2.5.1 Immunhistochemische Färbungen

HO-1 und GFAP

Aus Gründen der Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Gruppen, den behandelten und unbehandelten Tieren sowie den verschiedenen Färbungen wurde bei jedem Schnitt in der ipsilateralen Hemisphäre eine Auszählung in sechs Regionen vorgenommen. Die Regionen wurden von medial nach lateral mit A-F bezeichnet, diese liegen in unterschiedlichen Abständen zur Läsion (Abb. 7). In den als läsionsfern bezeichneten Regionen A, D, E, und F wurden jeweils 7 Zählfelder über die Dicke des Kortex ausgezählt, in den als läsionsnah bezeichneten Regionen B und C (medial bzw. lateral der Läsion) wurden jeweils 3 Zählfelder ausgezählt (Abb. 7).



Abb. 7: Schematische Darstellung eines frontalen Schnittes mit eingezeichneten Zählfeldern (Bregma-3,3 mm).

Die positiv markierten Zellen der Antikörperfärbungen HO-1 und GFAP wurden pro Gruppe an jeweils n=6 Gehirnen ausgezählt. Dabei wurden für jedes Gehirn 4 bis 6 Schnitte erfasst, an jedem Schnitt die 34 Zählfelder der 6 Regionen evaluiert. Ein Zählfeld umfasst ein Areal von 0,19 mm x 0,19 mm, was einer Fläche von $3,6x10^{-2}$ mm² entspricht. Bei ca. 95% entsprechen die 7 zusammenhängenden Zählfelder den Regionen A, D, E, F und damit genau der Dicke des Kortex. In seltenen Ausnahmen kommt es in der läsionsfernen Region F durch die Nähe zur Fissura rhinalis zu einer verringerten Kortexdicke, wodurch manchmal nur 6 Zählfelder ausgezählt werden konnten (Abb. 7). In diesem Fall wurde eine statistische Interpolation auf 7 Zählfelder durchgeführt, so dass jedes Zählfeld der läsionsfernen Regionen mit denen der Regionen F vergleichbar blieb.

Um die Verteilung positiver Zellen in den aus unterschiedlich vielen Zählfeldern bestehenden Kolumnen vergleichen zu können, wurde der gemittelte Wert pro Kolumne auf ein Zählfeld umgerechnet. In einer läsionsnahen Region befinden sich drei einzelne Zählfelder mit einer Gesamtgröße von 0,57 mm x 0,19 mm, was einer Fläche von 0,11 mm² entspricht. Eine Kolumne der läsionsfernen Regionen umfasst sieben Zählfelder von der Gesamtgröße 1,33 mm x 0,19 mm, was einer Fläche von 0,25 mm² entspricht (Abb. 8).



Abb. 8: Schematische Abbildung eines frontalen Hirnschnittes mit eingezeichneten Kolumnen (Bregma-3,3mm).

COX-2

Da bei der COX-2 Färbung bereits makroskopisch ein großer Unterschied in der Verteilung COX-2 positiver Zellen, sowohl ipsi- wie auch kontralateral erkennbar war (Abb. 20 bis 23), dieser aber durch Auszählung einzelner Zellen nicht diskriminiert werden konnte, erfolgte die Auswertung über die Ermittlung der optischen Dichten. Hierfür wurden die Schnitte mit einer hochauflösenden CCD-Kamera aufgenommen und die Änderungen in der OD mittels senkrecht zur Kortexoberfläche gelegter Profile entlang dieser Linie als Profilkurven ausgegeben. Da sich die Verteilung der positiv gefärbten COX-2 Zellen hauptsächlich auf die Lamina II und III beschränkte, wurde nach Auswertung der Profilkurven aus diesen die mittleren OD in Lamina I, Lamina II-III und Lamina IV-VI extrahiert, wodurch eine präzisere Quantifizierung möglich war.



Abb. 9: Schematische Abbildung eines frontalen Hirnschnittes mit den Regionen in denen die Profile zur Bestimmung der optischen Dichte gelegt wurden.

Zur Errechnung der mittleren optischen Dichten wurden Profile über die gesamte Dicke des Kortex gelegt. Es wurden dabei jeweils vier Regionen, sowohl ipsi- wie auch kontralateral berücksichtigt (Abb. 9, OD1=medial der Läsion, OD2=lateral der Läsion, OD3=parietaler Kortex, OD4=gutatorischer Kortex). Pro Tier wurden für jede Region immer 20 Profile gelegt, zumeist erfolgte dies mit je 5 Profilen/Region an 4 Schnitten eines Tieres. Standen jedoch einmal nur 3 Schnitte zur Verfügung oder waren 5 Schnitte vorhanden, so wurden dementsprechend mehr bzw. weniger Profile gelegt, so dass auf jeden Fall am Ende für jedes Tier, für jede Region 20 Profile zur Verfügung waren.

Amygdala

Ebenfalls makroskopisch auffällig waren COX-2 positive Färbungen in der Amygdala. Zur Bestimmung der optischen Dichte in der Amygdala wurde sowohl die interessierende Region ipsi- und kontralateral sowie ein Hintergrundswert durch umfahren einer Region ohne Schnitt auf dem selben Objektträger erfasst. Da nicht in allen Gruppen ausreichend Schnitte mit angeschnittener Amygdala vorhanden waren, konnten lediglich die optischen Dichten der 12h/1h und der 2d/1h Tiere ermittelt werden. Für diese Gruppen wurden die mittleren optische Dichten sowohl für den Hintergrund wie auch für die ipsi- und kontralaterale Amygdala ermittelt.

2.5.2 Doppelimmunfluoreszenz

An den Fluoreszenz-Färbungen wurden keine quantitativen, sondern lediglich qualitative Auswertungen vorgenommen. Die Färbungen wurden mit dem Konfokalen Lasermikroskop (Klinik für Gastroenterologie, Heapatolgie und Infektiologie) betrachtet und mithilfe des angeschlossenen Computers und des Programms TCNS abgespeichert. Diese wurden zur qualitativen Evaluierung der Verteilung verschiedener HO-1 positiver Gliazelltypen genutzt und einige typische wurden exemplarisch ausgedruckt.

2.5.3 Datenanalyse

Sowohl die Zellzahlen der Kolumnen und Zählfelder wurden tabellarisch erfasst, ebenso die optischen Dichten. Mittelwerte und Standardabweichung wurden zunächst für einzelne Individuen, nachfolgend für Gruppen ermittelt. Diese wurden in einer Varianzanalyse mit Messwiederholung auf signifikante Unterschiede untersucht. Bei dieser ANOVA handelt es sich um eine Varianzanalyse mit zwei Faktoren: Status (1,25 (OH)₂ D₃ oder E-Öl) und Gruppe (12h/1h, 1d/1h, 2d/1h, 2d/12h und 5d/1h/48h). Bei den COX-2 Färbungen wurde als zusätzlicher Faktor die Hemisphärenabhängige Verteilung einbezogen.

Außerdem wurde ein t-Test durchgeführt, um die Unterschiede in den einzelnen Kolumnen bzw. den Zählfeldern der zwei Behandlungsgruppen miteinander zu vergleichen. Unterschiede werden dann als signifikant gewertet, wenn das Signifikanzniveau eine vorgegebene Irrtumswahrscheinlichkeit von p≤0,01 unterschreitet. Das Signifikanzniveau wurde auf diesem hohen Level angesetzt, da bei der Berechnung keine Korrektur eingefügt wurde, um die Betrachtung abhängiger Faktoren (da die Regionen aus einem Kortex stammen) zu beurteilen.

p<0,01

*

Status:1,25 Dihydroxyvitamin D3, ErdnussölBehandlung:12h/1h, 1d/1h, 2d/1h, 2d/12h und 5d/1h/48h

Bei der optischen Dichte handelt es sich um eine Darstellung eines Grauwertes und dieser wird ohne Einheit angegeben. Der Wert ergibt sich wie folgt:

 $OD = \frac{\log \text{ eintretende Lichtmenge}}{\log \text{ austretende Lichtmenge}}$



HO-1: Kontrolltier ohne Infarkt

Abb. 10: Photomikroskopische Aufnahmen eines Frontalschnittes eines Kontrolltieres ohne Infarkt, in dem die HO-1 positiven Zellen visualisiert wurden. a: Übersichtsabbildung des Frontalschnittes, der nahezu ungefärbt erscheint. b: Eine stärkere Vergrößerung zeigt HO-1 positive Zellen im Hippocampus, wohingegen der Kortex ungefärbt bleibt. c + d: HO-1 positive Zellen im Gyrus dentatus des Hippocampus. e + f: Ausschnittsvergrößerungen aus c, aus denen ersichtlich wird, dass es sich bei den positiven Zellen um Neurone handelt.



HO-1: 1,25 Dihydroxyvitamin D3, 1d/1h

Abb. 11: Übersichtsabbildung und Ausschnittvergrößerungen eines 1d/1h Infarkttieres, welches mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelt wurde. a + c: Ausschnittsabbildungen aus dem lateralen bzw. medialen Läsionsrand, in denen eine sehr hohe Anzahl HO-1 positiver Gliazellen gefunden wird. d + e: Ipsi- und kontralateraler Hippocampus mit HO-1 positiven Neuronen im Hippocampus. f: Ausschnitt aus dem ipsilateralen gustatorischen Kortex. g: Ausschnitt aus f, der einzelne HO-1 positive Gliazellen zeigt. h + i: Ausschnittsvergrößerung aus dem Thalamus.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Verteilung HO-1 immunoreaktiver Gliazellen *Bildtafeln*

Die Verteilung HO-1 immunoreaktiver (IR) Zellen wird für die einzelnen Gruppen der mit E-Öl bzw. mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Infarkttiere und der Kontrolltiere ohne Infarkt (Abb. 10) anhand von repräsentativen Schnitten durch je eine Übersichtsabbildung mit Ausschnittvergrößerungen dargestellt. Dabei wurden bei Infarktgruppen die Zeitpunkte 1d/1h (Abb. 11 und 12) und 5d/1h/48h (Abb. 13 und 14) ausgewählt, stellvertretend für alle Untersuchungszeiten. Anschließend wird für alle Gruppen und alle Zeitpunkte der Mittelwert HO-1 positiver Zellen anhand von Diagrammen dargestellt (Abb. 15).

Kontrolltiere ohne Infarkt:

Bei Schnitten von Kontrolltieren ohne Infarkt sieht man makroskopisch keine HO-1 spezifische Anfärbung im Kortex, so dass diese Präparate der Kontrollfärbung ähnlich sind, bei welcher der erste AK durch ein Normalserum ersetzt wurde (Abb. 10). Jedoch sieht man bei mikroskopischer Analyse die multipolaren Neurone im Gyrus dentatus des Hippocampus, da sie deutlich HO-1 positiv sind. Diese Neurone, die als einzige im Telencephalon und Diencephalon HO-1 konstitutiv exprimieren, dienen daher zusätzlich als interne Kontrolle für eine funktionierende Färbemethode, die ausreichend sensitiv ist. Hingegen traten im Kortex, im Striatum, im Thalamus, in der Amygdala und in allen anderen betrachteten Regionen des Gehirns ohne Infarkt keine HO-1 positiv markierten Zellen auf.

Infarkttiere:

Da sich bei den untersuchten Infarktgruppen die HO-1 positiv markierten Zellen nur in ihrer Anzahl, nicht aber ihrem Verteilungsmuster unterscheiden, erfolgt zunächst eine Beschreibung der in allen Infarktgruppen geltenden Zellverteilung. Die hiervon abweichende spezifische Verteilungscharakteristik wird anschließend in Diagrammen für die läsionsnahe Region B (Abb. 17) und die läsionsferne Region D dargestellt (Abb. 18). Die Verteilung in den übrigen Regionen ist dem Anhang zu entnehmen.

Wie bereits aus den Übersichtsabbildungen der 1d pl Tiere hervorgeht, findet man im Gewebe medial und lateral der Läsion eine starke Anfärbung HO-1 positiver Gliazellen (Abb. 11 und 12). In den Ausschnittvergrößerungen erscheinen einzelne markierte Mikrogliazellen und Astrozyten; die Astrozyten weisen sowohl normalgeformte wie auch hypertrophe Zellkörper auf. Die Anzahl HO-1 IR Gliazellen ist im Randbereich der Läsion sehr hoch und in allen

HO-1: Erdnußöl, 1d/1h



Abb. 12: Übersichtsabbildung und Ausschnittvergrößerungen eines 1d/1h Infarkttieres, welches mit Lösungsmittel E-Öl behandelt wurde. a + c: Ausschnittsabbildungen aus dem lateralen bzw. medialen Läsionsrand, in denen eine hohe Anzahl HO-1 positiver Gliazellen gefunden wird. d + e: Ipsi- und kontralateraler Hippocampus mit HO-1 positiven Neurone im Hippocampus. f + i: Ausschnitt aus dem ipsi- bzw. kontralateralen gustatorischen Kortex mit einer geringen Anzahl HO-1 positiver Gliazellen in der ipsilateralen und keinen Zellen in der kontralateralen Hemisphäre. g + h: Ausschnittsvergrößerung aus dem Thalamus.

Laminae des Kortex nahezu gleich. In den lateral weiter entfernten Regionen, z.B. im gustatorischen Kortex, zeigt sich mit zunehmender Entfernung eine geringere Anzahl IR Zellen, deren Verteilung in den einzelnen Laminae des Kortex nicht mehr gleichmäßig verläuft, sondern einen Gradienten aufweist: Die Zahl der HO-1 IR Gliazellen ist in der obersten Lamina (I) höher und wird mit jeder tiefer gelegenen Lamina (II bis VI) geringer.

Betrachtet man das Auftreten der HO-1 IR Gliazellen im Zeitverlauf, so lässt sich generell eine transienter Verlauf verzeichnen. Sowohl Lösungsmittelkontrollen wie auch mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelte Tiere weisen 12h pl eine geringe Anzahl HO-1 IR Zellen auf, wobei die der mit E-Öl behandelten in allen Kolumnen höher liegt. Zwischen 12h pl und 1d pl ist ein Anstieg der HO-1 IR Zellen zu verzeichnen, der bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren sogar für alle Kolumnen signifikant ist (Abb. 11, 12, 15 a und b). Dieser generell für alle Kolumnen und Behandlungen geltende Effekt war zwischen 1d und 2d pl nicht mehr zu beobachten. Im Weiteren werden die Tiere, die 1h pl behandelt wurden, beschrieben. Während man bei den 2d pl Tieren, die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelt wurden, für die medialen Kolumnen A und B im Vergleich zu 1d pl eine verringerte Anzahl HO-1 IR Gliazellen findet, ist in den restlichen, lateral gelegenen Kolumnen C-F ein leichter Anstieg zu bemerken (Abb. 15b und c). Bei den mit E-Öl behandelten 2d pl Tieren erfolgt in den Kolumnen A und D eine leichte Abnahme, wohingegen die Kolumnen B, C, E und F einen Anstieg der Zellzahlen aufweisen (Abb. 15c).

Bei der Untersuchung der Frage, ob der Zeitpunkt der Gabe einen Einfluss auf die HO-1 Induktion spielt, zeigte sich für die 2d pl Tiere, die erst 12h pl E-Öl verabreicht bekamen, nur eine geringe Veränderung. Die spätere Gabe des Hormons führte hingegen zu einer stark erhöhten Anzahl HO-1 IR Zellen in allen Kolumnen (Abb. 15 d). Von 2d pl nach 5d pl ist eine signifikante Abnahme in den läsionsfernen Kolumnen zu verzeichnen, die sowohl für die mit E-Öl behandelten wie auch die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere zutrifft (Abb. 13, 14, 15c und e). Während in den läsionsfernen Kolumnen die Zellzahlen auf nahezu 0 absinken, ist in den läsionsnahen Regionen B und C nur eine geringe Abnahme zu verzeichnen. Der Unterschied zwischen den mit Lösungsmittel und den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren ist weiterhin signifikant (Abb. 13, 14 und 15e).



HO-1: 1,25 Dihydroxyvitamin D3, 5d/1h/48h

Abb. 13: Übersichtsabbildung und Ausschnittvergrößerungen eines 5d/1h/48h Infarkttieres, welches mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelt wurde. a + c: Ausschnittsabbildungen aus dem lateralen bzw. medialen Läsionsrand, in denen eine hohe Anzahl HO-1 positiver Gliazellen gefunden wird. d + e: Ipsi- und kontralateraler Hippocampus mit HO-1 positiven Neuronen im Hippocampus. f + i: Ausschnitte aus dem ipsi- bzw. kontralateralen gustatorischen Kortex, welche den Einfluss der Läsion auf die Anzahl HO-1 positiver Gliazellen verdeutlicht. g + h: Ausschnittsvergrößerung aus dem Thalamus.

HO-1: Erdnußöl, 5d/1h/48h



Abb. 14: Übersichtsabbildung und Ausschnittvergrößerungen eines 5d/1h/48h Infarkttieres, welches mit dem Lösungsmittel E-Öl behandelt wurde. a + c: Ausschnittsabbildungen aus dem lateralen bzw. medialen Läsionsrand, in denen eine hohe Anzahl HO-1 positiver Gliazellen gefunden wird. d + e: Ipsi- und kontralateraler Hippocampus mit HO-1 positiven Neuronen im Hippocampus. f + i: Ausschnitte aus dem ipsi- bzw. kontralateralen gustatorischen Kortex, welche den Einfluss der Läsion auf die Anzahl HO-1 positiver Gliazellen verdeutlicht. g + h: Ausschnittsvergrößerung aus dem Thalamus.



Verteilung HO-1 positiver Glia in den Kolumnen

Abb. 15: Anzahl HO-1 positiver Gliazellen (+/- S.D.) in den Kolumnen A-F zu verschiedenen Zeiten pl (a-e). Schwarze Punkte markieren die Werte der Lösungsmittelkontrollen, weiße Punkte stehen für die Werte der mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.

Diagramme

- Kolumnen

Um einen ersten Überblick zu erhalten, ist zunächst eine Übersichtsdarstellung zur Verteilung HO-1 positiver Gliazellen im Infarktgehirn hilfreich. Aus diesem Grund wird in den nebenstehenden Diagrammen die Zellverteilung in den Kolumnen im Kortex sowohl für die mit E-Öl wie auch die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Infarkttiere zu den verschiedenen postläsionalen Untersuchungszeiten dargestellt (Abb. 15).

<u>1h pl behandelte Tiere:</u>

Der Vergleich in der **12h Gruppe** (Tab. 2, Gruppen 1 und 6) zeigt bei den mit E-Öl behandelten Infarkttieren eine erhöhte Anzahl HO-1 positiver Zellen in den läsionsnahen Regionen B und C (mit 7,89 Zellen pro Kolumne (Z/K) in B, medial und 7,59 Z/K in C, lateral der Läsion) gegenüber geringen Zellzahlen in den läsionsfernen Kolumnen (zwischen 2,44 Z/K in A und 1,59Z/K in E), die untereinander vergleichbar sind (Abb. 15a). Hingegen weisen die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere nahezu gleichbleibend niedrige Zellzahlen verteilt über alle Kolumnen auf (zwischen 0,48 Z/K in C und 1,40Z/K in F; Abb. 15 a).

Die Anzahl HO-1 positiver Zellen stellt sich nach Ablauf weiterer 12 Stunden wie folgt dar: Betrachtet man die Abbildung der **1d Gruppe** (Tab. 2, Gruppen 2 und 7), erkennt man kaum eine Veränderung im Kurvenverlauf der Lösungsmittelkontrollen, ihre durchschnittliche Zellzahl steigt in jeder Kolumne nur unerheblich an (Abb. 15b). Vergleicht man hingegen die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere mit denen der des vorherigen Zeitpunktes (12h/1h), zeigt sich ein signifikanter Anstieg in jeder Kolumne. Besonders die läsionsnahen Kolumnen zeichnen sich durch deutliche Zunahme HO-1 positiver Zellen aus. In den läsionsfernen Kolumnen ist der Anstieg ebenfalls so stark, dass hier die Zellzahl immer deutlich über der von unbehandelten Infarkttieren liegt (Abb. 15 b).

Zwischen 24h und 48h pl unterscheiden sich die Tiere, die 1h pl mit E-Öl injiziert wurden, nicht gravierend, deshalb werden hier nur die Besonderheiten hervorgehoben:

Während in den läsionsfernen Kolumnen der mit E-Öl behandelten Tiere (mit Ausnahme von Kolumne E) der **2d Gruppe** (Tab. 2, Gruppen 3 und 8) keine erhöhten Zellzahlen auftraten, zeigten die läsionsnahen einen deutlichen Anstieg HO-1 positiver Zellen (Abb. 15c). Bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren zeigt sich in den läsionsnahen Kolumnen eine geringere Zellzahl im Vergleich zu den 1d/1h Tieren in Kolumne B (medialer Läsionsrand) bei gleichzeitigem Anstieg in Kolumne C (lateraler Läsionsrand) (Abb. 15 c).

12h pl und 1h/48h pl behandelte Tiere:

Bei den **2d pl Tieren, die 12h pl** (Tab. 2, Gruppen 4 und 9) entweder mit Lösungsmittel oder mit 1,25 (OH)₂ D₃ injiziert wurden, war die Anzahl HO-1 positiver Gliazellen in allen Kolumnen (A bis F) der mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere signifikant erhöht gegenüber den Lösungsmittelkontrollen (Abb. 15 d). Der Vergleich der 2d/12h Gruppe mit der 2d/1h Gruppe zeigt für die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere eine erhöhte Anzahl HO-1 positiver Gliazellen in allen Kolumnen. Keine bis nur geringe Erhöhungen zum vorherigen Zeitpunkt weisen hingegen die mit E-Öl behandelten Tiere auf. Deshalb ist die Differenz bei den 2d/12h pl Tieren zwischen den mit E-Öl und den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren größer (Abb. 15 d).

Nach **5d pl** (Tab. 2, Gruppe 10) zeigen die Tiere der Lösungsmittelkontrollen, die 1h pl und 48h pl behandelt wurden, eine verringerte Anzahl HO-1 positiver Gliazellen in den läsionsnahen Kolumnen B (6,13 Z/K) und C (6,73 Z/K) wie auch in den läsionsfernen Kolumnen (0,01 bis 0,15 Z/K). Auch die Anzahl HO-1 positiver Gliazellen bei den zu den gleichen Zeiten mit 1,25 (OH)₂ D₃ injizierten Tieren (Tab. 2, Gruppe 5) war im Vergleich zu den 2d Tieren verringert, jedoch lagen die Zellzahlen der läsionsnahen Kolumne B und C (13,88 Z/K bzw. 13,23 Z/K) immer noch signifikant über denen der mit E-Öl behandelten Tiere zu vergleichen (Abb. 15 e). Da in den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere 2d pl die Anzahl HO-1 positiver Zellen in allen Kolumnen signifikant über denen der Lösungsmittelkontrollen lag wird deutlich, dass die Behandlung mit 1,25 (OH)₂ D₃ 5 Tage pl nur zu einer starken Abnahme HO-1 IR Zellen in den läsionsfernen Kolumnen führt.

- Zählfelder

Die folgenden Diagramme (Abb. 17 und 18) zeigen die Anzahl HO-1 positiver Gliazellen in den Zählfeldern der Kolumnen zu den verschiedenen Untersuchungszeiten pl bei Infarkttieren, die mit E-Öl behandelt wurden und bei Infarkttieren, die mit 1,25 (OH)₂ D_3 behandelt wurden.

Da die Zellzahl nicht allein vom Abstand einer Region zum Läsionszentrum, sondern auch von der jeweiligen Lamina abhängt, wird nachfolgend die Auswertung in den durch Zählfelder unterteilten Kolumnen gezeigt. Zusätzlich erfolgt eine Einteilung in läsionsnahe Regionen (Zählfelder der Kolumnen B und C) und läsionsferne Regionen (Zählfelder der Kolumnen A, D, E, F). Die Verteilung der Zellzahlen weist in den läsionsnahen Zählfeldern starke Ähnlichkeiten auf, dies gilt auch für die Verteilung innerhalb der läsionsfernen Zählfelder, so dass im folgenden je ein repräsentatives Diagramm für die läsionsnahen Zählfelder der Region B und eines für die läsionsfernen der Region D beschrieben wird.

Läsionsnahe Regionen:

Die Untersuchung der läsionsnahen Regionen B und C mit einem Abstand von 200 bis 300 µm zum Infarkt wurde in nur 3 Zählfeldern durchgeführt, da aufgrund der Läsion und ihrer Auswirkung in diesem Bereich keine lamina-abhängige, sondern eine gleichmäßige Verteilung auftritt und daher eine Auszählung in allen Zählfeldern nicht erforderlich ist. Dies steht im Gegensatz zu den läsionsfernen Regionen, welche in den oberflächlichen Laminae höhere Zellzahlen aufweisen und somit Anlaß für die Auszählung über die gesamte Kortexdicke war. Die Zählfelder D2, D4, D6 wurden C1, C2, C3 nach folgender Methode gegenüber-gestellt, damit der Bezug von läsionsfernen zu läsionsnahen Zählfeldern erkennbar wird (Tab. 3 und Abb. 16; Bsp. für D und C, gilt jedoch für alle):

Zählfelder läsionsfern	Zählfelder läsionsnah
D1	
D2	C1
D3	
D4	C2
D5	
D6	C3
D7	

Tab. 3: Vergleichbarkeit der läsionsnahen und -fernen Zählfelder



Abb. 16: Zählfelder der Regionen C und D.



Verteilung HO-1 positiver Glia in den Zählfeldern der Kolumne B

Abb. 17: Anzahl HO-1 positiver Gliazellen (+/- S.D.) in der Kolumne B zu verschiedenen Zeiten pl (a-e). Schwarze Punkte markieren die Werte der Lösungsmittelkontrollen, weiße Punkte stehen für die Werte der mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.

Zählfelder der Kolumne B:

Die Anzahl der HO-1 positiven Zellen in den Zählfeldern der Kolumne B wird stellvertretend für die läsionsnahen Zählfelder beschrieben (Abb. 17), da sowohl die Zellzahlen sowie deren Verteilung für die Kolumne C nahezu gleich ist (Diagramm: Anhang, Abb. 39).

1h pl behandelte Tiere:

Sowohl bei den mit E-Öl wie auch bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren tritt in den medial der Läsion gelegenen Zählfeldern der Kolumne B zu allen Zeitpunkten eine nahezu gleichbleibende Verteilung HO-1 positiver Zellen auf, die nur geringfügig in Richtung B3 abnimmt. In der **12h/1h Gruppe** weisen die Lösungsmittelkontrollen signifikant höhere Zellzahlen (von 8,5 (B1) bis 6,7 (B3) HO-1 positiven Zellen/Zählfeld (Z/Z)) gegenüber den 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren (mit Zellzahlen von 0,5 (B1) bis 0,7 (B3) Z/Z; Abb. 17) auf. Für die **1d/1h**, **2d/1h** und **2d/12h Gruppen** gilt, dass die Anzahl HO-1 positiver Zellen bei den Lösungsmittelkontrollen in allen Zählfeldern signifikant niedriger sind als bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren. In der **1d/1h Gruppe** beträgt die Differenz 6 Z/Z in B1, 5,5 Z/Z in B2 und 4,6 Z/Z in B3 und ist somit für alle Zählfelder signifikant. Dies zeigt deutlich, dass die 1,25 (OH)₂ D₃ Applikation zu einem hochsignifikanten Anstieg HO-1 positiver Zellen zwischen 12h und 1d pl bewirkt.

Betrachtet man die **2d/1h Gruppen**, so sind die Unterschiede zwischen den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren (Tab. 2, Gruppe 3) gegenüber den Lösungsmittelkontrollen (Tab. 2, Gruppe 8) nicht so groß wie am 1. Tag (2,4 Z/Z für B1, 4 Z/Z für B2 und 3,6 Z/Z für B3). Die geringere Differenz ist durch nahezu gleichbleibende Zellzahlen bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren zwischen Tag 1 und 2 pl zu erklären, hingegen trat bei den mit E-Öl behandelten Tieren eine weitere Zunahme zwischen Tag 1 und 2 pl auf (Abb. 17c).

12h pl und 1h/48h pl behandelte Tiere:

Am **2d pl** war der Unterschied bei den nach **12h pl** mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren (Tab. 2, Gruppe 4) zur Lösungsmittelkontrolle (Tab. 2, Gruppe 9) noch ausgeprägter, da die Zellzahlen der mit E-Öl behandelten fast denen der nach 1h behandelten Tiere gleichen, hingegen die Zellzahlen der 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere um ca. 30% anstiegen (Abb. 17c und d). Daher war die Differenz zwischen den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren, die 1h (Tab. 2, Gruppe 3) oder 12h pl (Tab. 2, Gruppe 4) injiziert wurden, ebenfalls signifikant (mit 6,2 Z/Z für B1, 6,3 Z/Z für B2 und 6,4 Z/Z für B3, Abb. 17 c und d).

In der **5d/1h/48h Gruppe** lagen die Zellzahlen der mit 1,25 $(OH)_2$ D₃ behandelten Tiere (Tab. 2, Gruppe 5) im Vergleich zur 2d/12h Gruppe (Tab. 2, Gruppe 4) zwar geringer, lagen jedoch immer noch signifikant über denen der Lösungsmittelkontrollen: die Zellzahlen lagen mit 6,6 Z/Z (B1, B2) und 5,3 Z/Z (B3) um etwa 50% unter denen der 2d/12h Gruppe (Abb. 17d und e).



Verteilung HO-1 positiver Glia in den Zählfeldern der Kolumne D

Abb. 18: Anzahl HO-1 positiver Gliazellen (+/- S.D.) in der Kolumne D zu verschiedenen Zeiten pl (a-e). Schwarze Punkte markieren die Werte der Lösungsmittelkontrollen, weiße Punkte stehen für die Werte der mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.

Läsionsferne Regionen:

Die läsionsfernen Regionen (A, D, E, F) wurden in 7 Zählfelder pro Kolumne unterteilt, da hier eine lamina-abhängige Anzahl HO-1 positiver Zellen auftritt, die nur erfasst werden kann, wenn die gesamte Dicke des Kortex in einzelnen Zählfeldern untersucht wird.

Zählfelder der Kolumne D:

Die Anzahl der HO-1 positiven Zellen in den Zählfeldern der Kolumne D (Abb. 18) wird stellvertretend für die Zählfelder der Kolumnen A, E, F beschrieben, da sowohl die Zellzahlen sowie deren Verteilung für diese Kolumnen nahezu gleich sind (Diagramme: Anhang, Abb. 38, 40 und 41).

1h pl behandelte Tiere:

Die **12h/1h Gruppen** zeigen bei den mit E-Öl behandelten Tieren (Tab. 2, Gruppe 6) eine abnehmende Anzahl HO-1 positiver Zellen von Lamina I (D1, 7,6 Z/Z) nach Lamina VI (D7, 0,1 Z/Z; Abb. 18a). Hingegen nimmt die Zellzahl bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren (Tab. 2, Gruppe1) von D1 (0,1 Z/Z) in Richtung D5 (1,3 Z/Z) minimal zu, in Richtung D7 (0,9 Z/Z) wieder ab (Abb. 18a).

Bei den **1d/1h**, **2d/1h** und **2d/12h Gruppen** zeigen die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere eine erhöhte Anzahl HO-1 positiver Zellen im Vergleich zu den mit E-Öl behandelten Tieren. Während die Zellzahl bei den mit E-Öl behandelten Tieren insgesamt minimal erhöht ist, findet man bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren in allen Zählfeldern signifikant erhöhte Werte mit einem abnehmenden Gradienten von Zählfeld D1 in Richtung D7. Sowohl bei Lösungsmittelkontrollen wie auch bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren zeigte sich ein abfallender Gradient von der pialen Oberfläche (Zählfeld D1) in Richtung Lamina VI (Zählfeld D7; Abb. 18b bis d).

So zeigen die mit 1,25 (OH)₂ D₃ 1h pl injizierten Tiere um 51,9% höhere Werte gegenüber den Lösungsmittelkontrollen 1d pl. Nach 2d pl lagen die Werte mit 54,2% höher, während nach 2d pl die Tiere, die erst 12h pl mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelt wurden, sogar 68,6% mehr HO-1 positive Zellen pro Kolumne aufwiesen. Aus dieser prozentualen Darstellung über die gesamte Kolumne wird folgendes deutlich: Die Unterschiede sind bei allen Gruppen mit über 50% hoch-signifikant, bei den 2d/12h Gruppen liegen die Werte sogar über 68%. Während die Differenz zwischen den 1d/1h und 2d/1h Gruppen nur mit ca. 2% ansteigt, ist sie zwischen den 2d/1h und 2d/12h Gruppen mit ca. 14% wesentlich höher (Abb. 18b bis d).

12h pl und 1h/48h pl behandelte Tiere:

Vergleicht man die durchschnittlichen Zellzahlen der **2d/12h Gruppe** (Tab. 2, Gruppen 4 und 9) mit der 2d/1h Gruppe (Tab. 2, Gruppen 3 und 8), so ist zu erkennen, dass die Verabreichung des 1,25 (OH)₂ D₃ nach 12h gegenüber der Verabreichung nach 1h pl zu einer deutlichen Erhöhung der HO-1 IR führt (Abb. 18c und d). Im Gegensatz dazu tritt ein vom Behandlungszeitpunkt abhängiger Effekt bei Lösungsmittelkontrollen nicht auf.

In der **5d/1h/48h Gruppe** lassen sich kaum noch HO-1 positive Zellen finden (Abb. 18e). Die mit E-Öl behandelten Tiere (Tab. 2, Gruppe 10) weisen nur noch in D1 (0,79 Z/Z) und D2 (0,08 Z/Z) einzelne Zellen auf. Die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere (Tab. 2, Gruppe 5) zeigen ebenfalls nur geringe Zellzahlen, allerdings in allen Zählfeldern der Kolumne (0,40 bis 0,88 Z/Z) auf, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen postläsionalen Behandlungen zu verzeichnen sind (Abb. 18 e).



COX-2: Kontrolle ohne Infarkt

Abb. 19: Photomikroskopische Aufnahmen eines Frontalschnittes eines Kontrolltieres ohne Infarkt, in dem die COX-2 positiven Zellen visualisiert wurden. a + c: Ausschnitt aus der linken bzw. rechten Hemisphäre des retrosplenialen Kortex mit COX-2 positiven Zellen in den Laminae II/III und V. b: Übersichtsabbildung des Frontalschnittes, der hauptsächlich in den Laminae II und III eine starke, gleichmäßige Verteilung aufweist. d + e: COX-2 positive Zellen in den Regionen CA2 und CA3 sowie im Gyrus dentatus des Hippocampus. f + i: Striatum der linken bzw. rechten Hemisphäre. g + h: Thalamus. j + m: Gustatorischer Kortex; die gleichmäßige Verteilung in beiden Hemisphären wird sichtbar. k: COX-2 Färbung in der Amygdala mit stärkerer Anfärbung des lateralen Kerngebietes. l: Ausschnitt aus dem piriformen Kortex.



COX-2: 1,25 Dihydroxyvitamin D3, 12h/1h

Abb. 20: Photomikroskopische Aufnahmen eines Frontalschnittes eines 12h Infarkttieres, welches 1h pl mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelt wurde, in dem die COX-2 positiven Zellen visualisiert wurden. a + c: Ausschnitt aus der lateral bzw. medial gelegenen Regionen der Läsion. b: Übersichtsabbildung des Frontalschnittes; die starke Erhöhung der COX-2 IR wird auf der ipsilateralen Seite sichtbar. d + e: COX-2 IR im Hippocampus in den Regionen CA2 und CA3 sowie im Gyrus dentatus. f + i: Striatum der ipsi- bzw. kontralateralen Hemisphäre. g + h: Thalamus mit kugeligen IR Zellen. j + m: Gustatorischer Kortex; die erhöhte IR ipsilateral wird deutlich. k + l: COX-2 Färbung in der Amygdala mit stärkerer Anfärbung des lateralen Kerngebietes und stärkerer Markierung auf der ipsilateralen Seite.

3.1.2 Verteilung COX-2 immunoreaktiver Neurone

Bildtafeln

Die Verteilung COX-2 immunoreaktiver (IR) Neurone wird für die Gruppen der mit E-Öl bzw. mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Infarkttiere und der Kontrolltiere ohne Infarkt (Abb. 19) anhand von repräsentativen Schnitten durch je eine Übersichtsabbildung mit Ausschnittsvergrößerungen dargestellt. Dabei wurden bei Infarktgruppen die Zeitpunkte 12h/1h (Abb. 20 und 21) und 2d/1h (Abb. 22 und 23), stellvertretend für alle Untersuchungszeiten ausgewählt. Anschließend wird für alle Gruppen und alle Zeitpunkte der Mittelwert COX-2 positiver Zellen in den Laminae II und III anhand von Diagrammen dargestellt (Abb. 24).

Kontrolltiere ohne Infarkt:

Betrachtet man die Verteilung COX-2 positiver Zellen bei Tieren ohne Infarkt (Abb. 19) bzw. bei "Sham"-operierten Tieren, so findet man eine geringe Zellzahl, die sich symmetrisch über beide Hemisphären verteilt. Diese Verteilung tritt im Kortex hauptsächlich in den Laminae II und III auf, wobei eine Zunahme COX-2 positiver Neurone vom cingulären bzw. retrosplenialen zum piriformen Kortex beobachtet werden kann. Im Hippocampus findet man symmetrisch verteilt COX-2 positive Neurone in der CA3-Region und im Hilus, ebenso wie in den verschiedenen Kerngebieten der Amygdala (Abb. 19).

Infarkttiere:

Da sich bei den untersuchten Infarktgruppen die COX-2 IR Neurone nur in ihrer Anzahl, jedoch nicht im Verteilungsmuster unterscheiden, erfolgt zunächst eine Beschreibung der für alle Infarktgruppen geltenden Zellverteilungsmuster. Die hiervon abweichende spezifische Verteilungscharakteristik wird anschließend in Diagrammen für die Laminae II und III in allen Regionen zu allen Untersuchungszeitpunkten dargestellt (Abb. 24).

Die Infarkthirne zeigen in der kontralateralen Hemisphäre eine Verteilung COX-2 IR Neurone, ähnlich der bei Kontrolltieren ohne Infarkt. Hingegen ist in der ipsilateralen Hemisphäre eine auffallend starke Expression COX-2 IR Zellen in den Laminae II-III zu finden (Abb. 20-23). Ein Vergleich der Ausschnittabbildungen von **lateral** und **medial der Läsion** gelegenen Arealen zeigt lateral eine höhere Anzahl COX-2 IR Neurone. Im **Hippocampus** hat der Infarkt keinen einseitigen Einfluss auf Anzahl und Verteilung der COX-2 IR Neurone, die COX-2 IR ist symmetrisch verteilt. In beiden Hemisphären tritt im Grenzbereich zwischen CA1 und CA2 eine geringe Markierung im Stratum pyramidale auf, diese Lamina bleibt in der Region CA1 nahezu ungefärbt. Eine starke Anfärbung zeigt sich im Stratum pyramidale in den Regionen CA2, CA3 und im Gyrus dentatus, sowie im Stratum granulosum.



COX-2: Erdnußöl, 12h/1h

Abb. 21: Photomikroskopische Aufnahmen eines Frontalschnittes eines 12h Infarkttieres, welches 1h pl mit E-Öl behandelt wurde, in dem die COX-2 positiven Zellen visualisiert wurden. a + c: Ausschnitt aus der lateral bzw. medial gelegenen Regionen der Läsion. b: Übersichtsabbildung des Frontalschnittes; die starke Erhöhung der COX-2 IR wird auf der ipsilateralen Seite sichtbar. d + e: COX-2 IR im Hippocampus in den Regionen CA2 und CA3 sowie im Gyrus dentatus. f + i: Striatum der ipsi- bzw. kontralateralen Hemisphäre. g + h: Thalamus der ipsi- bzw. kontralateralen Hemisphäre. j + m: Gustatorischer Kortex; die erhöhte IR ipsilateral wird deutlich. k + l: COX-2 Färbung in der Amygdala mit stärkerer Markierung auf der ipsilateralen Seite.

Im **Thalamus** ist ebenfalls eine symmetrische Verteilung zu erkennen; hier werden sowohl ipsi- wie auch kontralateral kleinere gliale Zellkörper COX-2 immunoreaktiv, bei denen es sich aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer Morphologie um Oligodendrozyten oder Mikroglia handeln könnte. Im **gustatorischen Kortex** tritt in den Hemisphären wieder eine asymmetrische Färbung auf. Hier zeigt sich in der ipsilateralen Hemisphäre eine deutliche Erhöhung der COX-2 IR Neurone, besonders in den Laminae II und III. Auch in der **Amygdala** ist eine asymmetrische Verteilung zu finden: Die Kerngebiete werden partiell unterschiedlich intensiv angefärbt. Dies betrifft nicht nur die Anzahl der Neurone, sondern auch die Anfärbung des Neuropil.



COX-2: 1,25 Dihydroxyvitamin D3, 2d/1h

Abb. 22: Photomikroskopische Aufnahmen eines Frontalschnittes eines 2d Infarkttieres, welches 1h pl mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelt wurde, in dem die COX-2 positiven Zellen visualisiert wurden. a + c: Ausschnitt aus der lateral bzw. medial gelegenen Regionen der Läsion. b: Übersichtsabbildung des Frontalschnittes; die Erhöhung der COX-2 IR auf der ipsilateralen Seite ist geringer als 12h pl. d + e: COX-2 IR im Hippocampus in den Regionen CA2 und CA3 sowie im Gyrus dentatus. f + i: Striatum der ipsi- bzw. kontralateralen Hemisphäre. g + h: Thalamus der ipsi- bzw. kontralateralen Hemisphäre. j + m: Gustatorischer Kortex; die erhöhte IR ipsilateral wird deutlich. k + 1: COX-2 Färbung in der Amygdala mit stärkerer Anfärbung der ipsilateralen Seite.

C а b 1 mm 100 µm 100 µm d 250 µm 250 u h i f 100 µm g 100 µm 100 µm 100 µn I k m 250 µm 250 µm 100 µm 100 µm

COX-2: Erdnußöl, 2d/1h

Abb. 23: Photomikroskopische Aufnahmen eines Frontalschnittes eines 2d Infarkttieres, welches 1h pl mit E-Öl behandelt wurde, in dem die COX-2 positiven Zellen visualisiert wurden. a + c: Ausschnitt aus der lateral bzw. medial gelegenen Regionen der Läsion. b: Übersichtsabbildung des Frontalschnittes; die starke Erhöhung der COX-2 IR wird auf der ipsilateralen Seite sichtbar. d + e: COX-2 IR im Hippocampus in den Regionen CA2 und CA3 sowie im Gyrus dentatus. f + i: Striatum der ipsi- bzw. kontralateralen Hemisphäre. g + h: Thalamus der ipsi- bzw. kontralateralen Hemisphäre. j + m: Gustatorischer Kortex; die erhöhte IR ipsilateral wird deutlich. k + 1: COX-2 Färbung in der Amygdala mit stärkerer Markierung auf der ipsilateralen Seite.



Optische Dichte COX-2 positiver Zellen in den Laminae II-III

Abb. 24: Optische Dichte COX-2 positiver Zellen in Laminae II und III. Schwarze Punkte markieren die Werte von nicht infarzierten Kontrolltieren, hellgraue Dreiecke die Werte von 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Infarktieren und dunkelgraue Punkte die von infarzierten Lösungsmittelkontrollen. Signifikanzberechnung zwischen 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten und Kontrolltieren ohne Infarkt sind mit * markiert (p<0,01).

Diagramme

- Verteilung im Kortex

Die Diagramme zur optischen Dichte COX-2 positiver Zellen in den einzelnen Laminae zeigen, dass bei Kontrolltieren ohne Infarkt in beiden Hemisphären immer gleiche optische Dichten gemessen wurden. Das heißt, dass normalerweise eine symmetrische konstitutive Expression vorliegt (Abb. 19 und 24). Um einen Vergleich mit den Infarkttieren zu ermöglichen, wurden der linken und rechten Hemisphäre der Kontrolltiere im Diagramm die Bezeichnungen ipsi- und kontralateral zugewiesen.

Die Infarkttiere zeigen sowohl in den mit E-Öl- wie auch in den mit 1,25 $(OH)_2 D_3$ behandelten Tieren eine asymmetrische Verteilung der optischen Dichten (Abb. 24). Wie bereits erwähnt, wird die COX-2 IR in den Zellen der Laminae II und III induziert, daher zeigte sich nach Auswertung der Gesamtprofile, dass eine lamina-abhängige Quantifizierung der OD sinnvoll war (Lamina I, Laminae II-III und Laminae IV-VI). Da der Infarkt hauptsächlich die COX-2 IR in den Laminae II und III des Kortex und der Amygdala beeinflusst, werden zunächst nur diese Regionen beschrieben. Die Diagramme zur Verteilung in den übrigen Laminae sind dem Anhang zu entnehmen (Abb. 42 und 43).

- Verteilung in den Laminae II bis III

<u>1h pl behandelte Tiere:</u>

Beim Vergleich der OD kontralateral in der **12h/1h Gruppe** zeigen die mit 1,25 (OH)₂ D₃ wie auch die mit E-Öl behandelten Tiere eine nahezu gleiche OD, die Kontrolltiere ohne Infarkt weisen hingegen in allen gemessenen Regionen die höchsten Werte auf (Abb. 24 b). Ipsilateral zeigt die OD bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren den höchsten Wert, bei den mit E-Öl behandelten Tieren ist die OD etwas geringer (Abb. 24 a). Bei den Kontrolltieren ohne Infarkt ist die OD mit nahezu gleichbleibenden Werten in allen Regionen am geringsten. Interessanterweise zeigte die Region OD1 (Abb. 9 und 24a) bei nicht infarzierten Ratten und Lösungsmittelkontrollen gleiche Werte.

Die **1d/1h Gruppe** weist bei allen untersuchten Tieren $(1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3, \text{ E-Ol}, \text{ Kontrolltiere}$ ohne Infarkt) in den Regionen OD2 und OD3 kontralateral gleiche OD auf (Abb. 24 d). In den Regionen OD1 und OD4 zeigen die OD's jedoch keine identischen Werte, liegen aber dennoch dichter beisammen als bei der 12h/1h Gruppe.

Die Unterschiede der OD's zwischen den Kontrolltieren und den Infarkttieren sind auf der ipsilateralen Seite bei den 1d Tieren noch größer als bei den 12h Tieren (Abb. 24 c). Während die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere in der Region OD4 im Vergleich zu den mit E-Öl behandelten eine geringere OD aufweisen, ist diese in der Region OD1 wesentlich höher. In

den dazwischen liegenden Regionen OD2 und OD3 zeigen beide Infarktgruppen nahezu gleiche Werte (Abb. 24 c).

Die Differenz der OD bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren und den Kontrolltieren ohne Infarkt liegt in der Region OD1 bei 0,114, in der Region OD4 bei 0,265. Durch die Behandlung mit 1,25 (OH)₂ D₃ ist im Vergleich zu den mit E-Öl behandelten Tieren kein gravierender Unterschied in der Verteilung COX-2 positiver Zellen zu finden, mit Ausnahme der Region OD1 (0,090) (Abb. 24 c).

In der **2d/1h Gruppe** liegen kontralateral bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere alle OD unterhalb der Werte bei Kontrolltieren ohne Infarkt, wobei die Abnahme jedoch nicht signifikant ist (Abb. 24 f). Auch die Werte der mit E-Öl behandelten Tiere liegen zumindest in den Regionen OD1 und OD4 unterhalb, in den Regionen OD2 und OD3 nahezu gleich mit den Werten der nicht infarzierten Kontrollen (Abb. 24 c).

Die bei Infarkttieren, die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelt wurden, ipsilateral gelegenen Regionen der 2d/1h Tiere (Tab. 2, Gruppe 3) zeigen im Vergleich zu den 12h/1h (Tab. 2, Gruppe 6) und 1d/1h (Tab. 2, Gruppe 7) Gruppen geringere Differenzen zu den Kontrollen (die Differenzen liegen mit 0,017 in der Region OD1 bis 0,125 in der Region OD4) (Abb. 24 e). Dadurch wird deutlich, dass in den hormonbehandelten Infarkttieren die COX-2 IR abnimmt, aber immer noch über dem Kontrollniveau liegt. Die mit E-Öl behandelten Infarkttiere weisen in den Regionen OD2, OD3 und OD4 Werte, die oberhalb der bei Kontrolltieren ohne Infarkt liegen.

12h pl und 1h/48h pl behandelte Tiere:

Die **2d/12h Gruppe** zeigt bei den Kontrolltieren ohne Infarkt gleichbleibende OD's, bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren (Tab. 2, Gruppe 4) parallel dazu verlaufend, kontralateral geringere Werte (Abb. 24 h). Die OD der mit E-Öl behandelten Tiere liegen in der Region OD4 gleich, in den Regionen OD2 und OD3 leicht oberhalb der Werte der Kontrolltiere ohne Infarkt. In der Region OD1 zeigen sich gleiche OD wie bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren, ca. 0,060 unterhalb des Wertes bei Kontrolltieren ohne Infarkt. Ipsilateral zeigen sich in den Regionen OD2, OD3 und OD4 bei den Lösungsmittelkontrollen und den 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren wie bei der 2d/1h Gruppe OD's, die oberhalb der Werte nicht infarzierter Kontrolltiere. Nur in der Region OD1 zeigt sich eine Abnahme der OD sowohl nach E-Öl wie auch nach 1,25 (OH)₂ D₃ Behandlung (Abb. 24 g), während in den Regionen OD2, OD3 und OD4 die Werte der mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere mit gleichmäßigem Abstand immer unterhalb der Werte der Lösungsmittelkontrollen bleiben (Differenz 0,031 in Region OD2 bis 0,038 in Regionen OD3 und 4; Abb. 24 g).

Die **5d/1h/48h Gruppen** (Tab. 2, Gruppen 5 und 10) weisen kontralateral bei allen Behandlungsgruppen parallel verlaufende Werte der OD in den einzelnen Regionen auf. Dabei zeigen die Kontrolltiere ohne Infarkt die höchsten Werte, die mit E-Öl behandelten Tiere geringere und die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten die geringsten Werte (Abb. 24 j). Ipsilateral liegt in der Region OD4 nur noch der Wert der mit E-Öl behandelten Tiere oberhalb der von Kontrolltieren ohne Infarkt (Abb. 24 i). Die OD der mit E-Öl und der mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere verlaufen parallel, wobei die Werte der mit E-Öl behandelten Tiere in den Regionen OD2, OD3 und OD4 annähernd gleich zur OD bei Kontrolltieren ohne Infarkt sind (Abb. 24 i). Die OD in der Region OD1 liegt jedoch um 0,065 tiefer als der Wert bei Kontrolltieren ohne Infarkt.





Abb. 25: Optische Dichte von COX-2 in der Amygdala in Kontrolltieren ohne Infarkt und in Infarkttieren, welche mit 1,25 (OH)₂ D₃ bzw. E-Öl behandelt wurden. Signifikanzunterschiede (p<0,05) sind mit * markiert.
- Verteilung in der Amygdala

Kontrolltiere ohne Infarkt zeigen ipsilateral OD's von 0,2221 und kontralateral von 0,2111. Die Differenz von 0,011 lässt eine nahezu gleichmäßige Verteilung der COX-2 Färbung in der Amygdala bei Tieren ohne Infarkt erkennen. Hingegen liegt die OD bei Infarkttieren ipsilateral höher als kontralateral. Dies trifft sowohl für die mit E-Öl sowie für die mit 1,25 $(OH)_2 D_3$ behandelten Tiere zu. Die OD des Hintergrunds ist in den verschiedenen Gruppen mit Werten von 3,0 x e⁻⁴ bis 6,6 x e⁻³ sehr gering und wird darum in der Darstellung vernachlässigt.

<u>1h pl behandelte Tiere:</u>

In der **12h/1h Gruppe** liegt bei den mit E-Öl behandelten Tieren die gemittelte OD ipsilateral bei 0,2199 und kontralateral bei 0,172. Die mit 1,25 $(OH)_2$ D₃ behandelten Tiere derselben Gruppe weisen insgesamt niedrigere Werte auf: Während die OD ipsilateral bei 0,1819 liegt, erreicht sie kontralateral nur einen Wert von 0,1375. Damit zeigt die OD sowohl ipsi- wie auch kontralateral bei den mit E-Öl, wie auch bei den mit 1,25 $(OH)_2$ D₃ behandelten Tieren eine nahezu gleiche Differenz. Bei der **2d/1h Gruppe** werden gegenüber der 12h/1h Gruppe insgesamt höhere OD's erreicht, die mit E-Öl behandelten Tiere zeigen ipsilateral Werte von 0,2532 und kontralateral von 0,2141. Wiederum liegen die OD's der mit 1,25 $(OH)_2$ D₃ behandelten Tiere insgesamt niedriger mit ipsilateral 0,2352 und kontralateral 0,1927.

Die OD's in der Amygdala wurden mithilfe einer Varianzanalyse mit Meßwiederholung auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass kein Statuseffekt auftritt, d.h. beim Vergleich der OD bei den mit E-Öl mit den 1,25 $(OH)_2 D_3$ behandelten Tiere treten keine signifikanten Unterschiede auf. Hingegen sind die Unterschiede der ipsilateralen zur kontralateralen Amygdala signifikant (p=0,05), woraus hervorgeht, dass kortikale photothrombotische Läsionen eine amygdaloidäre Erhöhung der COX-2 IR in der infarzierten Hemisphäre bewirken. 12 h pl zeigen sich noch keine signifikanten Unterschiede für die amygdaloidäre COX-2 IR zwischen den Gruppen, während am zweiten Tag pl sowohl die mit E-Öl behandelten (p=0,015) wie auch die mit 1,25 $(OH)_2 D_3$ behandelten Tiere signifikante Unterschiede (p=0,020) zwischen infarzierter und nicht infarzierter Seite aufweisen.



GFAP: Kontrolltier ohne Infarkt

Abb. 26: Photomikroskopische Aufnahmen eines Frontalschnittes eines Kontrolltieres ohne Infarkt, in dem die GFAP positiven Astrozyten visualisiert wurden. a: Ausschnitt aus dem piriformen Kortex mit einer hohen Anzahl GFAP positiver Astrozyten. b: Übersichtsabbildung des Frontalschnittes. c: Ausschnitt aus dem frontalen Kortex, in dem konstitutiv exprimierte GFAP positive Astrozyten sichtbar werden. d + e: Eine stärkere Vergrößerung zeigt GFAP positive Astrozyten, die im ganzen Hippocampus verteilt sind. f + g: GFAP positive Astrozyten im Thalamus, hauptsächlich in dem zum Ventrikel angrenzenden Gewebe. h + k: Gleichmäßige Verteilung im gustatorischen Kortex. i + j: Gleichmäßige Verteilung GFAP positiver Astrozyten im Striatum.

3.1.3 Verteilung GFAP immunoreaktiver Astrozyten

Bildtafeln

Für alle untersuchten Tiergruppen wird die Verteilung GFAP positiver Zellen eines repräsentativen Schnittes mit Übersichtsabbildung und Ausschnittvergrößerungen gezeigt. Dabei wurden bei Infarktgruppen die Zeitpunkte 1d/1h und 2d/12h ausgewählt, stellvertretend für alle Untersuchungszeiten. Anschließend wird für alle Gruppen und alle ausgezählten Zeitpunkte (2d/1h, 2d/12h, 5d/1h/48h) die spezifische Zellverteilung mit Hilfe der Mittelwerte anhand von Diagrammen dargestellt.

Kontrolltiere ohne Infarkt:

Betrachtet man die Verteilung GFAP positiver Astrozyten bei Kontrolltieren ohne Infarkt, so zeigen sich einige wenige Markierungen symmetrisch über beide Hemisphären verteilt. Diese Astrozyten treten im Kortex hauptsächlich an der Oberfläche und den an die weiße Substanz angrenzenden Laminae auf. Hingegen lassen sich in den Arealen des piriformen und entorhinalen Kortex GFAP positive Astrozyten in allen Laminae finden (Abb. 26). Im Hippocampus findet sich in allen Regionen und Laminae eine hohe Anzahl GFAP positiver Astrozyten, an der Oberfläche des angrenzenden Thalamus hingegen nur wenige.

Infarkttiere:

Da sich bei den untersuchten Infarktgruppen GFAP positiv markierte Astrozyten nur in ihrer Anzahl, nicht aber in ihrem Verteilungsmuster unterscheiden, erfolgt zunächst eine Beschreibung der in allen Infarktgruppen geltenden Zellverteilung. Die hiervon abweichende spezifische Verteilungscharakteristik wird stellvertretend für alle läsionsnahen und läsionsfernen Regionen in Diagrammen für die Regionen B und D, wie bereits bei den HO-1 positiven Gliazellen, dargestellt. Die Verteilung in den übrigen Regionen ist dem Anhang zu entnehmen.

Aus den Übersichtsabbildungen und Ausschnittsabbildungen geht hervor, dass in der 1d/1h Gruppe ebenso wie in der nicht abgebildeten 12h/1h Gruppe GFAP positive Astrozyten nur gefäßassoziiert auftreten, sich ab dem 2d pl hingegen im Gewebe medial und lateral der Läsion eine starke Anfärbung GFAP positiver Astrozyten befindet (Abb. 27 und 28). Im Randbereich der Läsion sind die markierten Astrozyten gegenüber den Kontrollen stark erhöht und über alle Laminae gleichmäßig verteilt. In den lateral weiter entfernten Regionen zeigt sich in den mittleren Laminae eine geringere Färbung, wie zuvor bei den Kontrolltieren ohne Infarkt beschrieben. Hingegen findet man in der 2d/12h (Abb. 29 und 30) und 5d/1h/48h Gruppe in allen Regionen und Laminae des infarzierten Kortex eine gleichmäßige Verteilung.



GFAP: 1,25 Dihydroxyvitamin D3, 1d/1h

Abb. 27: Photomikroskopische Aufnahmen eines Frontalschnittes eines 1d Infarkttieres, das 1h pl mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelt wurde, mit Visualisierung GFAP positiver Astrozyten. a: Ausschnitt aus dem lateralen Läsionsrand mit GFAP positiv markierten Blutgefäßen. b: Übersichtsabbildung des Frontalschnittes. c: Ausschnitt aus dem medialen Läsionsrand mit GFAP positiv markierten Blutgefäßen. d + e: Eine stärkere Vergrößerung zeigt GFAP positive Astrozyten, die im ganzen Hippocampus verteilt sind. f + g: Der Thalamus weist ebenfalls keine GFAP positiven Astrozyten auf. h + k: Einzelne GFAP markierten Blutgefäße im ipsi- bzw. kontralateralen gustatorischen Kortex. i + j: Striatum mit einem auf der ipsilateralen Seite deutlich markierten Blutgefäß.



GFAP: Erdnußöl, 1d/1h

Abb. 28: Photomikroskopische Aufnahmen eines Frontalschnittes eines 1d Infarkttieres, das 1h pl mit E-Öl behandelt wurde, mit Visualisierung GFAP positiver Astrozyten. a: Ausschnitt aus dem lateralen Läsionsrand mit GFAP positiv markierten Blutgefäßen. b: Übersichtsabbildung des Frontalschnittes. c: Ausschnitt aus dem medialen Läsionsrand mit GFAP positiv markierten Blutgefäßen. d + e: Hippocampus mit GFAP positiven Astrozyten, die gleichmäßig verteilt sind. f + g: Der Thalamus weist ebenfalls keine GFAP positiven Astrozyten auf. h + k: Einzelne GFAP markierten Blutgefäße und vereinzelte GFAP positive Astrozyten im ipsi- bzw. kontralateralen gustatorischen Kortex. i + j: Striatum der ipsi- und kontralateralen Seite.



GFAP: 1,25 Dihydroxyvitamin D3, 2d/12h

Abb. 29: Photomikroskopische Aufnahmen eines Frontalschnittes eines 2d Infarkttieres, das 12h pl mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelt wurde, mit Visualisierung GFAP positiver Astrozyten. a: Ausschnitt aus dem lateralen Läsionsrand mit hoher Anzahl GFAP positiver Astrozyten. b: Übersichtsabbildung des Frontalschnittes. c: Ausschnitt aus dem medialen Läsionsrand mit hoher Anzahl GFAP positiver Astrozyten. d + e: Hippocampus mit GFAP positiven Astrozyten. f + g: Ipsi- bzw. kontralateraler Thalamus. h + k: Ipsi- bzw. kontralateraler gustatorischer Kortex mit sehr hoher Anzahl GFAP positiver Astrozyten ipsilateral. i + j: Striatum der ipsi- und kontralateralen Seite.



GFAP: Erdnußöl, 2d/12h

Abb. 30: Photomikroskopische Aufnahmen eines Frontalschnittes eines 2d Infarkttieres, das 12h pl mit E-Öl behandelt wurde, mit Visualisierung GFAP positiver Astrozyten. a: Ausschnitt aus dem lateralen Läsionsrand mit hoher Anzahl GFAP positiver Astrozyten. b: Übersichtsabbildung des Frontalschnittes. c: Ausschnitt aus dem medialen Läsionsrand mit hoher Anzahl GFAP positiver Astrozyten. d + e: Hippocampus mit GFAP positiven Astrozyten. f + g: Ipsi- bzw. kontralateraler Thalamus. h + k: Ipsi- bzw. kontralateraler gustatorischer Kortex mit sehr hoher Anzahl GFAP positiver Astrozyten ipsilateral. i: Striatum der ipsilateralen Seite. j: Ausschnitt aus h, siehe auch b.



Verteilung GFAP positiver Astrozyten in den Kolumnen

Abb. 31: Anzahl GFAP positiver Astrozyten (+/- S.D.) in den Kolumnen A-F zu verschiedenen Zeiten pl (a-c). Schwarze Punkte markieren die Werte der Lösungsmittelkontrollen, weiße Punkte stehen für die Werte der mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.

Diagramme

- Kolumnen

Um einen ersten Überblick zu erhalten, ist zunächst eine Übersichtsdarstellung zur Verteilung GFAP positiver Astrozyten im Infarktgehirn hilfreich. Aus diesem Grund wird in den folgenden Diagrammen die Zellverteilung in den Kolumnen im Kortex dargestellt, sowohl bei Infarkttieren, die mit E-Öl injiziert wurden, sowie den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten, zu den ausgewerteten Untersuchungszeiten pl (2d/1h, 2d/12h, 5d/1h/48h; Abb. 31).

<u>1h pl behandelte Tiere:</u>

Im Vergleich zur HO-1 findet man ebenfalls abhängig vom Abstand zur Läsion eine Änderung in der Verteilung GFAP positiver Zellen, jedoch scheint diese geringer auszufallen. In der **2d/1h Gruppe** finden sich sowohl in der Kolumne A, die zwischen den Arealen RSG und RSA lokalisiert ist, wie auch in der läsionsnahen Kolumne C, unmittelbar lateral der Läsion, nahezu gleiche Zellzahlen. In der dazwischen gelegenen Kolumne B, unmittelbar medial der Läsion, zeigen sich bei allen Gruppen die höchsten Werte (Abb. 31 a). Die Zellzahlen in den läsionsfernen Kolumnen D und E nehmen mit zunehmender Entfernung ab und sind niedriger als in A-C, während in der ventrolateralen Kolumne F höhere Werte als in D und E vorliegen. Dieser Verlauf gilt sowohl für die mit E-Öl wie auch die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere, wobei die Zellzahlen in den mit E-Öl behandelten Tieren in allen Kolumnen signifikant höhere Werte zeigen (Abb. 31 a). Dieser Befund zeigt, dass die GFAP-IR als Folge der Läsion generell erhöht ist, aber auch kortexareal-spezifische Schwankungen aufweist.

12h pl und 1h/48h pl behandelte Tiere:

Erst in den 2d/12h und 5d/1h/48h Gruppen ist durch den Infarkt eine gleichmäßigere Verteilung in allen Regionen zu finden, unabhängig von der Behandlungsmethode. Betrachtet man die Verteilung GFAP positiver Zellen in den einzelnen Kolumnen so lässt sich beobachten, dass in der 2d/1h und 2d/12h Gruppe die Anzahl positiver Zellen/Kolumne immer bei den mit E-Öl behandelten Tieren überwiegt. In der 2d/1h Gruppe sind wesentlich größere Differenzen gegenüber den 2d/12h Gruppen zu finden, in denen die Zellzahlen nur geringfügig unterhalb der mit E-Öl behandelten Tiere liegen. Die Unterschiede bei der 2d/1h Gruppe betragen zwischen 3,89 (C) bis 11,20 (E) Zellen/Kolumne. Bei der 2d/12h Gruppe betragen die Unterschiede hingegen nur 0,57 (A) bis 3,57 (E). In der 5d/1h/48h Gruppe werden nahezu identische Zellzahlen sowohl bei den mit E-Öl- wie auch den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren gefunden, hier liegt die Differenz nur bei 0,01 (C) bis 1,79 (B) Zellen/Kolumne.



Verteilung GFAP positiver Astrozyten in den Zählfeldern der Kolumne B

Abb. 32: Anzahl GFAP positiver Astrozyten (+/- S.D.) in der Kolumne B der 2d Infarkttieren die respektive 1h oder 12h pl und den 5d Infarkttieren die 1h und 48h pl behandelt wurden (a-c). Schwarze Punkte markieren die Werte der Lösungsmittelkontrollen, weiße Punkte stehen für die Werte der mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.

- Zählfelder

Die folgenden Diagramme zeigen die Anzahl GFAP positiver Astrozyten in den Zählfeldern der Kolumnen zu den verschiedenen Untersuchungszeiten pl bei Infarkttieren, die mit E-Öl behandelt wurden, sowie bei Infarkttieren, die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelt wurden (Abb. 32 und 33). Da die Zellzahl nicht allein vom Abstand einer Region zum Läsionszentrum, sondern z.T. auch von den jeweiligen Laminae abhängig ist, wird nachfolgend die Auswertung in den durch Zählfelder unterteilten Kolumnen gezeigt. Zusätzlich erfolgt eine Einteilung in läsionsnahe Regionen (Zählfelder der Kolumnen B und C) und läsionsferne Regionen (Zählfelder der Kolumnen A, D, E, F). Die Verteilung der Zellzahlen weist in den läsionsnahen Zählfeldern starke Ähnlichkeiten auf. Dies gilt auch für die Verteilung innerhalb der läsionsfernen Zählfelder, so dass im folgenden je ein repräsentatives Diagramm für die läsionsnahen Zählfelder der Region B und eines für die läsionsfernen der Region D beschrieben wird. Die Verteilung in den übrigen Regionen ist den Diagrammen im Anhang zu entnehmen (Abb. 44 bis 47).

Läsionsnahe Regionen:

Zählfelder der Kolumne B:

<u>1h pl behandelte Tiere:</u>

In den läsionsnahen Zählfeldern der Kolumne B (B1, B2, B3) liegt die Anzahl GFAP positiver Zellen/Zählfeld (Z/Z) bei den mit E-Öl behandelten 2d Tieren in der **2d/1h** (Tab. 2, Gruppe 8) und 2d/12h Gruppe (Tab. 2, Gruppe 9) höher als bei den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren (Tab. 2, Gruppen 3 und 4; Abb. 32 a und b). Die Differenz zwischen den mit E-Öl und den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren in der **2d/1h Gruppe**, die in allen Zählfeldern signifikant ist, liegt bei 5,7 Z/Z in B1, 3,79 Z/Z in B2 und 5,93 Z/Z in B3 (Abb. 32 a).

12h pl und 1h/48h pl behandelte Tiere:

Die Differenz der Lösungsmittelkontrollen zu den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren ist in den **2d/12h Gruppen** (Tab. 2, Gruppen 4 und 9) mit 2,25 Z/Z in B1, 4,07 Z/Z in B2 und 3,87 Z/Z in B3 geringer gegenüber der 2d/1h Gruppe und nicht mehr signifikant (Abb. 32 b). In der **5d/1h/48h Gruppe** erreichen die mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere (Tab. 2, Gruppe 5) höhere Werte GFAP positiver Z/Z, wobei die Differenz zwischen den mit 1,25 (OH)₂ D₃ und den mit E-Öl behandelten Tieren (Tab. 2, Gruppe 10) bei 2,98 Z/Z in B1, 1,82 Z/Z in B2 und 0,37 Z/Z in B3 beträgt (Abb. 32 c).



Verteilung GFAP positiver Astrozyten in den Zählfeldern der Kolumne D

Abb. 33: Anzahl GFAP positiver Astrozyten (+/- S.D.) in der Kolumne D der 2d Infarkttieren die respektive 1h oder 12h pl und den 5d Infarkttieren die 1h und 48h pl behandelt wurden (a-c). Schwarze Punkte markieren die Werte der Lösungsmittelkontrollen, weiße Punkte stehen für die Werte der mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.

Läsionsferne Regionen:

Zu den läsionsfernen Regionen gehören die Zählfelder der Kolumnen A, D, E, F. Die in manchen Gruppen lamina-abhängige Zellzahl GFAP positiver Astrozyten wird durch Auswertung von 7 Zählfeldern pro Kolumne erfasst. Stellvertretend für alle läsionsfernen Regionen werden hier die Zählfelder der Kolumne D beschrieben, alle übrigen finden sich im Anhang (Abb. 44, 46 und 47).

Zählfelder der Kolumne D:

<u>1h pl behandelte Tiere:</u>

In den läsionsfernen Zählfeldern der Kolumne D zeigt sich wie bei den Zählfeldern der Kolumne A eine ähnliche Verteilung: die **2d/1h Gruppe** weist wiederum bei den mit E-Öl behandelten Tieren (Tab. 2, Gruppe 8) höhere Werte gegenüber den mit 1,25 $(OH)_2 D_3$ behandelten (Tab. 2, Gruppe 3) auf. Der Kurvenverlauf ist bei beiden Behandlungsmethoden nahezu gleich, die Werte liegen wiederum in der Lamina I am höchsten (Zählfeld D1), nehmen zur Lamina III und IV hin ab und zur Lamina VI wieder zu (Zählfeld D7). Die Differenzen GFAP positiver Z/Z, die in allen Zählfeldern signifikant sind, betragen 3,81 (D1) bis 8,93 (D4) (Abb. 33 a).

12h pl und 1h/48h pl behandelte Tiere:

In der **2d/12h Gruppe** liegen bei den mit E-Öl behandelten Tieren die Werte in allen Zählfeldern höher, jedoch zeigen sich geringe, nicht signifikante Differenzen von 0,41 Z/Z (D3) bis 1,92 Z/Z (D5). Das bedeutet, dass die Gabe von 1,25 (OH)₂ D₃ 12h pl keinen gravierenden Einfluss mehr auf die Anzahl GFAP positiver Zellen auf läsionsferne Zählfelder hat (Abb. 33 b).

Bei der **5d/1h/48h Gruppe** werden nahezu identische Werte bei den mit 1,25 $(OH)_2 D_3$ (Tab. 2, Gruppe 5) und den mit E-Öl behandelten Tieren (Tab. 2, Gruppe 10) erreicht: Die Werte der mit 1,25 $(OH)_2 D_3$ behandelten Tiere liegen in den Zählfeldern D1 (0,11 Z/Z), D2 (0,58 Z/Z), D4 (0,06 Z/Z) und D7 (0,52 Z/Z) mit den angegebenen Differenzen geringfügig über denen der mit E-Öl behandelten Tiere (Abb. 33 c). Die mit E-Öl behandelten zeigen in den Zählfeldern D3 (0,53 Z/Z), D5 (1,12 Z/Z) und D6 (0,15 Z/Z) geringfügig höhere Werte gegenüber den mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren.

3.2 Doppelimmunfluoreszenz

3.2.1 HO-1 und GFAP

Die Fluoreszenz-Doppelmarkierung mit HO-1 (rot) und GFAP (grün) zeigt sowohl bei den mit 1,25 (OH)₂ D_3 wie auch bei den mit E-Öl behandelten Tieren eine Vielzahl kolokalisierte HO-1 positive Astrozyten. In der Nähe der Läsion wie auch in den oberen Laminae des Kortex werden die Filament-Enden grün, die Ansätze der Filamente gelb und die Zellkörper rot gefärbt (Abb. 34). Die Expression von HO-1 in Astrozyten 2d pl findet somit hauptsächlich im Zellkörper statt. Im Ansatz der Filamente wird sowohl HO-1 wie auch GFAP exprimiert. Mit der Abnahme der Zytosolmenge in den Zellfortsätzen, welche die Filamente umgeben, findet sich zunehmend grüne Anfärbung in den Fortsätzen.



Abb. 34: Rim-Bereich eines Frontalschnittes einer 2d/1h pl mit 1,25 $(OH)_2$ D₃ behandelten Ratte. Rot = HO-1 IR und grün = GFAP IR.

In den von der Läsion weiter entfernten Gebieten wie auch in den tieferen Laminae des Kortex ist die Anzahl HO-1 positiver Astrozyten geringer. Man findet z.B. in der Lamina V nur noch HO-1 positive Zellkörper, die Filamente weisen kaum HO-1 auf und sind ausschließlich GFAP positiv (Abb. 35). Außerdem zeigt die Abbildung deutlich die Verbindung von Astrozyten zu den vertikal im Bild verlaufenden Blutgefäßen.



Abb. 35: Lamina V eines Frontalschnittes einer 2d/1h pl mit 1,25 $(OH)_2$ D₃ behandelten Ratte. Rot = HO-1 IR und grün = GFAP IR.

3.2.2 HO-1 und OX-42

Eine Fluoreszenz-Doppelmarkierung mit HO-1 und OX-42 ergab sowohl bei den mit 1,25 $(OH)_2$ D₃ wie auch bei den mit E-Öl behandelten Tieren eine Färbung HO-1 positiver Mikrogliazellen. Im Verhältnis zu den HO-1 positiven Astrozyten traten diese jedoch in einer deutlich geringeren Anzahl auf. Die Färbung des Mikroglia-Markers wie auch des HO-1 Antikörpers verteilte sich über die gesamte Zelle gleichmäßig und nahm nicht nur Kompartimente der Zelle ein (Abb. 36).



Abb. 36: Rim-Bereich eines Frontalschnittes einer 2d/12h pl mit 1,25 $(OH)_2 D_3$ behandelten Ratte. Rot = HO-1 IR und grün = OX-42 IR.

3.2.3 HO-1 und MAG

Der Nachweis HO-1 positiver Oligodendrozyten erfolgte über eine Fluoreszenz-Doppelmarkierung mit HO-1 und MAG. Für den polyklonalen HO-1 Antikörper wurde der grüne DTAF-Zweitantikörper, für den monoklonalen MAG Antikörper der rote Cy3-Zweitantikörper eingesetzt. Dabei zeigen sich orange-gelbe, kugelige HO-1 positive Zellkörper, umgeben von rot gefärbtem positivem Myelin, welches an verschiedenen Stellen am Zellkörper anzusetzen scheint (Abb. 37). Betrachtet man die getrennten Farbkanäle und somit die einzelnen Färbungen, so färbt sich der HO-1 positive Zellkörper grün, wohingegen mit MAG sowohl der Zellkörper und das Myelin rot angefärbt wird.

Die Anzahl HO-1 positiver Oligodendrozyten ist wie bei den Mikrogliazellen wesentlich geringer gegenüber den Werten der HO-1 positiven Astrozyten.



Abb. 37: HO-1 und MAG Kolokalisation einer mit 1,25 (OH)₂ D_3 behandelten 2d/12h Ratte. Grün = HO-1 IR, rot = MAG IR und orange-gelb: Kolokalisation der Färbungen.

4 Diskussion

4.1 Generelle Aspekte

Die Untersuchung, ob das Hormon 1,25 (OH)₂ D₃ die postläsionalen Abläufe nach kortikaler photothrombotischer Läsion beeinflusst, war Ziel dieser Arbeit. Dabei kann man sich die bisher beschriebenen Stoffwechselwege nutzbar machen und einige relevante Parameter (wie z.B. Enzyme) untersuchen. Ein positiver Effekt könnte sowohl durch Hemmung neurodegenerativer als auch durch Förderung neuroprotektiver Prozesse auf Transkriptionsbzw. Translationsebene erzielt werden. Die Untersuchung wurde an Kontrolltieren ohne Infarkt, an infarzierten Tieren, die mit 1,25 (OH)₂ D₃, sowie infarzierten Tieren, die mit Lösungsmittel behandelt wurden, durchgeführt. Mithilfe unterschiedlicher Antikörperfärbungen erfolgte eine quantitative Analyse der regionalen und laminären Anzahl und Verteilung immunoreaktiver Zellen im Kortex aller untersuchten Tiergruppen.

In einem Tiermodell für Multiple Sklerose (MS) bei Nagern - der experimentellen allergischen Encephalomyelitis (EAE) - ist ein Aufhalten der MS mithilfe von 1,25 (OH)₂ D₃ bekannt (Garcion et al., 1997). Hierfür können jedoch sowohl immunosuppressive wie auch spezifisch neurologische Prozesse verantwortlich sein. Daher ist die Untersuchung der in die ischämischen Prozesse involvierten Marker unter Einfluss von 1,25 (OH)₂ D₃ aufgrund der Verwandtschaft beider Krankheitsbilder auch in einem Modell des Schlaganfalles interessant. Durch eine Behandlung mit 1,25 (OH)₂ D₃ konnte gezeigt werden, dass nach einer verzögert einsetzenden HO-1 IR eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu finden war, die aufgrund des bislang beschriebenen protektiven Charakters des Enzyms als wünschenswert zu erachten ist.

Die COX-2 IR wurde bei Infarkttieren sowohl in den mit 1,25 (OH)₂ D_3 behandelten Tieren wie auch in unbehandelten Tieren auf der ipsilateralen Seite im Vergleich zu nicht infarzierten Tieren gleichermaßen erhöht. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich jedoch noch kein Rückschluss ziehen, da bei gleichbleibender Summe der COX-Aktivität anteilige Veränderungen der Prostaglandin-Endprodukte nachgewiesen werden konnten (Montine et al., 1999) und somit je nach Verschiebung zu neuroprotektiven oder neurotoxischen Endprodukten ein Effekt vorliegen kann, ohne über die reine COX-Aktivität nachweisbar zu sein. GFAP Expression ist ein empfindlicher Marker für pathologische Veränderungen im ZNS. Da 1,25 (OH)₂ D_3 behandelte Tiere bei gleichzeitiger Erhaltung der HO-1 Expression geringere GFAP positive Zellzahlen aufwiesen, könnte dies auf eine protektive Wirkung hinweisen.

4.2 Methodische Aspekte

4.2.1 Standardversuchsbedingungen

Damit im Modell der Photothrombose die hier interessierenden wechselnden Parameter genau beurteilt werden konnten, mussten gleichbleibend stabile Versuchsbedingungen geschaffen werden. Die Dosis der Substanzen Bengal Rosa, des Hormons 1,25 (OH)₂ D₃ und des Lösungsmittels E-Öl wurden auf das Körpergewicht jedes einzelnen Tieres umgerechnet. Während des operativen Eingriffs wurde die Körpertemperatur durchgehend rektal gemessen und gegebenenfalls reguliert, um einem Absinken bzw. einer Erhöhung der Temperatur und daraus folgend einer Änderung in der Ausdehnung der Läsion vorzubeugen. Neben den in 2.2. (Material und Methoden) aufgeführten standardisierten Methoden zeigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Witte durch Einsatz intrazerebraler Sonden, dass die Temperatur der Laminae II und III des Kortex während der Belichtungszeit nur um maximal 0,5°C über der Kerntemperatur des Tieres lag, so dass eine Schädigung des Gewebes bzw. eine unerwünschte zusätzliche Auswirkung durch Temperaturanstieg auszuschließen war.

Das Läsionsvolumen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gemessen, da zahlreiche Befunde zeigen, dass neurologische Defizite und Läsionsgröße nicht notwendigerweise korreliert sind (Bamford, 1992). Zudem können einer ischämischen Episode folgend medikamentös-behandelte Nagetiere in Verhaltensmodellen leistungsfähiger sein, obwohl signifikant histologische Beschädigungen vorliegen (Rogers et al., 1992).

Bei zentralnervösen ischämischen Prozessen wurde für viele Substanzen die Expressionsinduktion auf Transkriptionsebene nachgewiesen, so z.B. auch für GABA_A-Rezeptoruntereinheiten (Neumann-Haefelin et al., 1999). Jedoch scheint bei ischämischen Schädigungen die energetische Situation des betroffenen Gewebes nicht auszureichen, um auch die Translation zu gewährleisten.

Sowohl 2 der 5 Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors wie auch die ³H-Muscimolbindung zeigen im Gegensatz zur Transkription eine signifikante Abnahme (Neumann-Haefelin et al., 1998; Witte and Stoll, 1997). Somit scheint ein Anstieg der Transkriptionsrate für mRNA in ischämischen Geweben keine Aussage über die Menge des letztendlich für die Funktion verantwortlichen Proteins zuzulassen.

Aus diesem Grund wurde hier das Auftreten der immunoreaktiven Endprodukte für HO-1, COX-2 und GFAP untersucht.

4.2.2 Das Modell des Schlaganfalls

Das Photothrombose-Modell, das in der vorliegenden Untersuchung herangezogen werden konnte, wurde zuerst von Watson et al. (1985) beschrieben. Die Stärken und die Schwächen dieses Modells sind in zusammenfassenden Artikeln behandelt worden (Ginsberg und Busto, 1989; Hunter et al. 1995). Dieses Modell simuliert nicht Gefäßverschlüsse in zerebralen Hauptarterienstämmen, wie sie häufig beim Menschen beobachtet werden. Ebensowenig ist es ein Modell für Hirnverletzungen, die durch eine Gefäßruptur zustande kommen. Das Photothrombose-Modell simuliert hingegen die Situation kleiner thromboembolischer Gefäßverschlüsse in den arteriellen Endverzweigungen, wie sie bei kleinen fokalen und multifokalen ischämischen Infarkten beobachtet werden. Dabei zeigt das Photothrombose-Modell einen schnellen Zusammenbruch der Bluthirnschranke (Engelhorn et al., 1998).

Weitere Vorteile sind u.a. die Möglichkeit langfristiger Experimente, da die Auswirkungen der Photothrombose nicht invasiv sind. Darüber hinaus sind die hervorgerufenen Läsionen sowohl von reproduzierbarer Größe und von präziser Lokalisation. Außerdem führt das Photothrombose-Modell zu einer scharfen Abgrenzung zwischen infarziertem und nichtinfarziertem umgebenden Gehirngewebe, wodurch eine Untersuchung der von der Läsion sekundär über degenerierende Faserbahnen geschädigten Regionen ermöglicht.

Jedoch lässt sich im Gegensatz zum MCAO-Modell keine eindeutige Penumbra nachweisen (ischämischer Halbschatten, Astrup et al., 1981), worunter man einen Bereich versteht, der zwar durchblutet wird, allerdings nicht in dem Maße, dass eine normale zelluläre Funktion gewährleistet ist (Witte, 1998). Somit wurde dieser scharf abgegrenzte Bereich im Photothrombose-Modell als Randbereich (rim) der Läsion bezeichnet (Bidmon et al., 1997a, 1998a).

4.2.3 Wirkung applizierter Substanzen

Der photosensitive Farbstoff Bengal Rosa

In einer *in vitro* Studie trat eine Gerinnung von belichtetem, durch Blutplättchen angereichertem Plasma unabhängig davon auf, ob zuvor die photosensitive Substanz Bengal Rosa verabreicht wurde oder nicht (Inamo et al., 1996). Hingegen konnte im *in vivo* Photothrombose-Modell gezeigt werden, dass eine Belichtung nur dann zur Thrombose führt, wenn zuvor eine ausreichend hohe Dosis Bengal Rosa verabreicht wurde (Watson et al., 1985). In unveröffentlichten Versuchen der Arbeitsgruppe Witte konnten die Resultate der Arbeit von Watson bestätigt werden, auch hier war keine Veränderung des Gewebes bei Kontrolltieren zu beobachten, die lediglich einer reinen Belichtung ausgesetzt waren.

Außerdem ist denkbar, dass bei reiner Belichtung ohne Gabe von Bengal Rosa eine Gerinnung nicht entstehen kann, weil zwischen Lichtleiter und Blut sowohl Schädeldecke wie auch Gefäßwand einen zusätzlichen optischen Filter bilden. Nur durch ausreichend dosierte Gabe von Bengal Rosa (0,4 ml der 10 mg/ml-Lösung) und der richtigen Lichtintensität konnte bei Belichtung ein Infarkt ausgelöst werden. Die Wahl einer möglichst geringen aber dennoch ausreichend hohen Dosis von Bengal Rosa ist deshalb erstrebenswert, weil eine zu hohe Dosierung unerwünschte Thrombosen in den haarlosen und vor Licht ungeschützten Körperteilen des Tieres (Ohren und Schwanz) bewirken kann.

Das Lösungsmittel Erdnussöl

Der Einsatz von sterilem Erdnussöl (E-Öl) als Lösungsmittel zur Injektion verschiedener Substanzen wurde bereits in mehreren Tiermodellen genutzt. E-Öl wird nicht nur bei Ratten (Gordon, 1994) und Hunden (Keates et al., 1999), sondern auch bei Kühen (Burke et al., 1996) zur Verabreichung fettlöslicher Substanzen verwendet. In einem Modell der traumatischen Gehirnverletzung (Wada et al., 1998) wurde ebenfalls E-Öl zur Gabe von Stickstoffmonoxid-Inhibitoren genutzt und zeigte keine Nebeneffekte. In vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe Bidmon bestätigte sich, dass auch bei Ratten keine Nebeneffekte auftraten.

Das Hormon 1,25 Dihydroxyvitamin D₃

Das Hormon 1,25 Dihydroxyvitamin D_3 wurde bereits als Langzeit-Therapeutikum bei Erkrankungen, wie Pseudovitamin-D-Defizienten-Rachitis, Osteomalazie und Osteoporose, erfolgreich eingesetzt. Der Wirkungszeitraum der aktiven Form des Hormons ist bei der Dosierung zu beachten, da bereits eine einzelne Dosis von 1,25 (OH)₂ D_3 nach 4 bis 8h einen Gipfel an Serum-Konzentration bewirkt, wobei diese nach 24h auf die Ausgangskonzentration abklingt.

Weitere klinische Erfahrungen haben gezeigt, dass sowohl die topikale wie auch die orale Verabreichung von 1,25 (OH)₂ D₃ bei der Behandlung von Psoriasis sehr erfolgreich eingesetzt werden kann (Holick, 1991). Dabei wird durch langsame Gewöhnung der Patienten durch gestaffelte, orale Gaben bis zu einer Dosis von 3 μ g/Tag das Hormon ohne toxische Nebeneffekte (wie z.B. Hyperkalzämie) vertragen.

Die in der hier vorliegenden Arbeit an der Ratte verabreichte Einzeldosis lag zwar mit 4 μ g/kg Körpergewicht wesentlich höher als bei der klinischen Anwendung, aber dennoch sowohl unterhalb der Einzeldosen sowie unterhalb der Summe mehrfach verabreichter Dosen, wie sie im Multiple Sklerose-Modell der Ratte zur Langzeit-Suppression der astrozytären iNOS erfolgreich eingesetzt wurden (Garcion et al., 1997). Für die vorliegende Arbeit wurde hingegen die in autoradiographischen Studien ermittelte Dosis von 4 μ g/kg Körpergewicht eingesetzt, da diese Menge optimal gesättigte Rezeptor-Dichten erzeugt. Zudem ist bekannt, dass der Durchschnittswert des 1,25 (OH)₂ D₃ im Blutplasma der Ratte mit 112 pg/ml +/- 11 doppelt bis vierfach höher liegt als beim Menschen (Thys-Jacobs et al., 1980), die in einer späteren Arbeit durch ähnliche Werte von 25-70 pg/ml bestätigt wurden (Holick, 1989).

Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass Vitamin D, die noch inaktive $1,25 (OH)_2 D_3$ Vorstufe, vor Multipler Sklerose schützt (Hayes et al., 1997). Wie sich allerdings bei einer weiteren Untersuchung herausstellte, genügte hierfür nicht der empfohlene Tagesbedarf von 400 IE, entsprechend 10 µg, (recommended daily allowance, RDA), es mussten etwa 10-fach höhere Werte (3800 IE, 950 µg) pro Tag eingenommen werden (Goldberg, 1974).

In einer weiteren Arbeit um die Diskussion der toxischen Menge kam es zur Angabe, dass durch ein Ganzkörper-Sonnenbad leicht eine äquivalente Menge von 250 μ g (10000 IE) der Vorstufen des Vitamin D₃ aufgenommen wird, die deshalb als physiologisches Limit diskutiert wurde (Vieth, 1999). Diese Diskrepanz zwischen wirksamer Dosis und Plasmaspiegel liegt vermutlich an der kompartimentalisierten in vivo Verteilung der Vitamin D Metabolite einschließlich des 1,25 $(OH)_2 D_3$. Während 25 Hydroxyvitamin D₃ gebunden am Bindungsprotein im Plasma zirkuliert, tritt das weniger lipophile 1,25 $(OH)_2 D_3$ schnell ins Gewebe über, wie sich aus den oben zitierten kurzen Plasma-Halbwertszeiten schließen lässt. Ferner ist für 1,25 $(OH)_2 D_3$, wie auch für andere Steroidhormone, eine Aufnahme ins Fettgewebe entscheidend, wodurch der verfügbare Pool für die Zielzellen reduziert wird, so dass derzeit keine klaren Angaben über die physiologisch wirksamen 1,25 $(OH)_2 D_3$ Konzentrationen in bestimmten Zielgeweben des Organismus vorliegen.

4.2.4 Vor- und Nachteile der verschiedenen Quantifizierungsmethoden

Die Zählfelder im Rim- und periläsionalen Kortex

Die Tatsache der konstant bleibenden Dicke des gesamten Kortex eines Tieres konnte bei der Auswertung des Zählfelder-Prinzips vorteilhaft genutzt werden, denn hierdurch war eine hervorragende Vergleichbarkeit der ermittelten Werte sowohl beim Einzeltier wie auch den Tieren einer Gruppe und den verschiedenen Gruppen untereinander gewährleistet. Nur unmittelbar neben der Fissura rhinalis verringert sich die Kortexdichte, so dass in einigen wenigen Schnitten lediglich 6 Zählfelder zwischen Pia und weißer Substanz zu plazieren waren. Um dennoch einen Vergleich zu ermöglichen, kam eine lineare Interpolation in der Weise zum Einsatz, dass 6 Zählfelder auf 7 hochgerechnet wurden. Dieses Verfahren erscheint zulässig, da in diesem Bereich des Kortex die betroffenen Laminae lediglich dünner als die von der Fissura rhinalis weiter entfernten Regionen sind, so dass durch die Interpolation alle Zählfelder auf die Laminadicke des Kortex angeglichen werden konnten. Hinzu kommt die Tatsache, dass es sich bei jedem Zählfeld genau genommen um ein Volumen und nicht um eine Fläche handelt, da die untersuchten Schnitte eine Dicke von 70 µm aufweisen. Die Anzahl der ermittelten positiven Zellen wurde deshalb für das gesamte Zählfeld und nicht pro mm² bzw. mm³ angegeben.

Die Profile zur Bestimmung der optischen Dichte

Bei der COX-2 Färbung war eine Zellzählung nicht möglich, da die COX-2 positiven Neurone hauptsächlich in den Laminae II und III so dicht auftraten, dass durch eine Zählung, selbst bei Fokussierung durch den Schnitt, nicht alle Zellen erfasst werden könnten. Aus diesem Grund wurde die Methode der OD-Messung gewählt.

Für die HO-1 und die GFAP Färbung kam wiederum keine OD-Messung in Frage, da sie durch die Hintergrundfärbung der Neurone, die bei der COX-2 nicht zu finden war, verfälscht würde. Darüber hinaus führt die Zählung der weit verzweigten Gliazellen zu genaueren Werten, da lediglich der Zellkörper und nicht die ebenfalls markierten Ausläufer gewertet werden, so dass die genaue Anzahl der Zelltypen ermittelt wird, in denen eine HO-1 bzw. GFAP Induktion erfolgt.

4.3 Auswirkungen des Infarktes auf das Gewebe im Photothrombose-Modell4.3.1 Ödeme

Aus anderen Studien an photochemisch induzierten Infarkten ist bekannt, dass als Folge der Infarkte aufgrund erhöhter Na⁺-Werte das Gewebewasser in den Zellen innerhalb von 4 bis 24h deutlich ansteigt (Green and Cross, 1994). Die Na⁺-Werte hatten sich dabei nach 24h signifikant um 61% erhöht, wohingegen die K⁺-Werte eine leichte Abnahme (9%) zeigten. Von der Ödembildung ist ausschließlich die ipsilaterale Infarktseite betroffen. Bereits aus einer älteren Arbeit (Uenohara et al., 1988) wird für die Ursache von ischämischen zerebralen Ödemen nicht allein eine verringerte Aktivierung von ATP-abhängigen Na⁺ und K⁺-ATPase angesehen, vielmehr werden zusätzlich Funktionsänderungen in den Ionen-Kanälen, die für eine Zunahme an freien Radikalen nach der Reperfusion verantwortlich sind, mit einbezogen. In einem Modell des permanenten Verschlusses der Arteria cerebri media (MCAO) wurde mithilfe der Kernspintomographie (MRI) das Ausmaß des zerebralen Ödems ermittelt (Seega and Elger, 1993). Hieraus ergab sich bei Untersuchung des Ödems nach 3, 24, 48 und 72h nach MCAO, dass die größte Ausdehnung bereits zum Zeitpunkt von 48h erreicht wurde, während im Modell der Photothrombose dies bereits nach 24h der Fall war (Grome et al., 1988).

4.3.2 Die Faserdegeneration

Die Darstellung von Faserdegenerationen kann mithilfe von Silberfärbungen in Neuronen, Axonen und Dendriten aufgezeigt werden. Aus einer bislang unveröffentlichten Studie der Arbeitsgruppe Witte ist bekannt, dass eine Woche nach der Induktion der Photothrombose eine ausgedehnte Verteilung von intensiv gefärbten agyrophilen Nervenfasern in den tiefen Laminae V und VI des Kortex und einer relativ geringen Färbungen in den Laminae II und III nachweisbar wird. Auch medial der Läsion in den Regionen des retrosplenialen Kortex (RSA und RSG) findet man agyrophile Fasern. Zu einem späteren Zeitpunkt ziehen agyrophile Fasern sogar bis in den entorhinalen Kortex. Auf der kontralateralen Seite wurde im homotopen Areal zur Läsion die intensivste Silberfärbung gefunden. Ebenso wurde eine dichte Silberfärbung in den ipsilateralen thalamischen Nuclei, besonders im posterioren Nucleus, welcher ebenfalls degenerierte neuronale Perikarya zeigte, gefunden. Mikrogliabzw. Makrophagen-Reaktionen wurden hauptsächlich in Bereichen, in denen Faser- und Neuronenverluste bekannt sind, ausgelöst und zeigten hier weniger ausgeprägt Färbungen gegenüber argyrophile Nervenfasern. Die ausgedehnte Vernetzung des Läsionsbereiches zeigte, dass Deafferentierung ein ursächlicher Faktor für die ausgedehnte Disinhibition und SOD-Veränderungen sein könnte, die auf fokale Hirnverletzung folgt. Aus den vorliegenden

Daten entnahm die Arbeitsgruppe Witte, dass als fokal angesehene Verletzungen nicht wirklich fokal sind, da durch die afferenten oder efferenten Verbindungen extrem weitverbreitete Gehirnbereiche von den Schädigungen ebenfalls betroffen wurden.

4.3.3 Weitere Marker im Modell der Photothrombose

Durch Nachweis von Änderungen in Zytoskelettproteinen und Proteoglykanen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein kortikaler Infarkt nicht nur eine lokal eingeschränkte Verletzung ist, sondern zu einer Vielzahl von Zytoskelett- und anderen Strukturveränderungen in weit verteilten aber funktionell miteinander verbundenen Bereichen des Gehirns führt (Bidmon et al., 1997a). Betrachtet man die Verteilung anderer Marker, wie z.B. die hoch effektiven endogenen Superoxiddismutasen (SOD), die den zytotoxischen Sauerstoff-Radikalen entgegen wirken, so fällt auf, dass sowohl die konstitutiv exprimierte Cu/Zn-SOD (Bidmon et al., 1997b) wie auch die induzierbare Mn-SOD (Bidmon et al, 1998a) sowohl in den periläsionalen Bereichen wie auch auf der kontralateralen Seite - ähnlich wie in der Silberfärbung- in der homotopen Region des Läsionszentrums signifikant erhöht auftreten. Etwa eine Woche nach diesen Prozessen wurden jedoch auch in weiter entfernten Regionen diese Färbungen in Neuronen und Gliazellen sichtbar und ließen vermuten, dass Radikale auch auf diese Regionen einen Einfluss in der Entwicklung der periläsionalen Übererregbarkeit haben können. Ebenfalls interessant ist die Betrachtung der IR von NOS-I positiven Zellen im Photothrombosemodell (Bidmon et al., 1998b), da das produzierte Radikal NO mit Superoxid zu der hoch zytotoxischen Substanz Peroxynitrit reagieren kann, wenn es zuvor nicht zu einer Beseitigung durch die SOD's kommt. In der Verteilung der konstitutiv exprimierten NOS-1 konnte mit Ausnahme des Zentrums, in dem bereits 4h pl keine positiven Neurone mehr vorhanden waren, keine Unterschiede in der Anzahl noch im Verteilungsmuster NOS-1 positiver Neurone zwischen 4h bis 14 Tagen zu Normaltieren gefunden werden. Jedoch zeigen die Ergebnisse, dass NOS positive Zellen in den Regionen in denen die COX-2 pl induziert vorliegen, so dass es aufgrund der räumlichen Nähe von COX-2 und NOS produzierenden Zellen sehr wahrscheinlich ist, dass Peroxynitrit entstehen kann.

Bei der Untersuchung der Verteilung von GABA_A-Rezeptoren nach photochemisch induziertem Infarkt konnte gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion der GABA_A-Rezeptorbindung kam (Que et al., 1998). Die Abnahme der GABA_A-Rezeptorbindung, die in den Laminae II und III der entfernten Regionen sowohl ipsi- wie auch kontralateral vorgefunden wurde, belief sich dabei auf 13 bis 27% im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Infarkt. Dabei ist auffällig, dass die Änderungen an GABA_A-Rezeptoren in den supragranulären Laminae auftreten, in denen auch die deutlichsten Änderungen der COX-2 gefunden wurden.

4.4 Interpretation der Ergebnisse der Antigen-Anfärbung

4.4.1 Allgemeines

Die Änderungen der Expression von Substanzen in Gliazellen, hervorgerufen durch die Photothrombose und beeinflussbar durch die Gabe von 1,25 Dihydroxyvitamin D3, sind insbesondere deshalb interessant, weil Gliazellen neben den Neuronen einen wichtigen Bestandteil im peripheren und zentralen Nervensystem bilden. Ihre Hauptfunktion ist die räumliche und metabotrophische Unterstützung der Neurone. Durch diese Funktion sind sie befähigt, sowohl die Morphologie wie auch die Funktionalität der Neurone zu modulieren (Grima et al., 1998; Melcangi et al., 1997). Während die Neurone Schaltstellen für Reizaufnahme, Erregungsleitung und Reizverarbeitung sind, bilden die Gliazellen eine Art "Nervenbindegewebe" (Neuroglia). Sie sind das Ernährungs- und Stützgewebe für die Neurone und dienen zusätzlich der Abwehr und zur Isolierung von Nervenfasern (Faller, 1995). Insbesondere haben die Astrozyten die Aufgaben extrazelluläre Neurotransmitter zu entfernen, zu verstoffwechseln und als inaktive Vorstufen den Neuronen zur Resynthese Verfügung zu stellen, was durch ihren charakteristischen Gehalt an Glutaminsynthetase deutlich wird (Hertz et al., 1999). Ebenso sind Astrozyten die Hauptkomponente des Glutathionstoffwechsels, welcher für die Limitierung von oxidativem Stress über die Entgiftung von H₂O₂ essentiell ist (Kussmaul et al., 1999). Im Vergleich zu den Neuronen haben Gliazellen die Möglichkeit zur Zellteilung, so dass sie Bereiche der durch Krankheit, Sauerstoffmangel oder Verletzung zugrunde gegangenen Neurone räumlich einnehmen können. Man unterscheidet im Zentralnervensystem drei Gruppen von Gliazellen anhand ihrer Form und Herkunft: Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten. Die Mikrogliazellen sind kleine Zellen mit zahlreich verzweigten Fortsätzen. Als aktivierte Abwehrzellen sind sie amöboid beweglich, phagozytotisch aktiv und zeigen eine ovoide Form. Oligodendrozyten sind kleine Zellen mit ausgedehnten Ausläufern, welche die Myelinscheiden um die Axone bilden, sie sind stark eisenhaltig und dienen auch als Eisenspeicher. Allerdings ist die Gesamtheit der Oligodendrozyten weitgehend unbekannt, da neuere Befunde andeuten, dass es eine Vielzahl von Subtypen gibt, die unterschiedlich reagieren (Rosenberger et al., 1999). Zudem gibt es eine große Zahl an Oligodendrozyten-Progenitorzellen (Keirstead et al., 1998), deren Funktion weitgehend unklar ist, außer dass sie bei pathologischen Prozessen Veränderungen zeigen. Astrozyten sind die größten Gliazellen und haben viele lange Fortsätze, die enge Verbindungen sowohl zu Kapillaren wie auch zu Neuronen bilden - besonders in der Umgebung der Synapsen - wodurch sie sowohl als Stützgewebe wie auch Bestandteil Blut-Hirn-Schranke als der funktionieren. Astrozyten können die

Extrazellulärmatrix kontrollieren Zusammensetzung der und sind für das Elektrolytgleichgewicht im Zentralnervensystem verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass Gliazellen, vor allem aber Astrozyten, am Metabolismus von Steroidhormonen und der Synthese von Neuro-Steroiden beteiligt sind (Melcangi et al., 1992, 1993), andererseits beeinflussen zirkulierende Steroidhormone die Dichte des GFAP-Proteins im Zytoplasma (Chowen et al., 1995; Luquin et al., 1993; Mong et al., 1996), worauf später noch näher eingegangen werden soll. Ferner sind sie im wesentlich am Aufbau einer Glianarbe beteiligt, welche das verletzte ZNS vor dem Zusammenbruch der Ionenzusammensetzung des Liquors bewahrt und darüber hinaus für die chemoelektrischen Eigenschaften der Erregungsleitung von eminenter Bedeutung ist.

4.4.2 HO-1 Färbung

Im Modell der Photothrombose werden konstitutiv HO-1 positive Neurone, die auch in Kontrolltieren ohne Infarkt vorhanden sind, ausschließlich im Hippocampus (CA4- und vereinzelte in der CA3-Region) gefärbt. Zusätzlich wird durch die Läsion die Expression von HO-1 positiven Gliazellen im Kortex induziert. Dieser Befund wird durch andere Studien an verschiedenen zerebralen Läsionsmodellen bestätigt (Kitamura et al., 1998; Maines, 1997; Vigne et al., 1995). In diesen Studien wurden HO-1 positive Leukozyten auch im Rim-Bereich gefunden, die in der vorliegen Arbeit nicht weiter quantifiziert wurden. Dass bei Kontrolltieren nur HO-1 positive Neurone im Hippocampus gefunden wurden, stimmt mit früheren Untersuchungen an Nagern, einschließlich verschiedenen Ratten-Zuchtstämmen, überein (Maines, 1997).

Vergleicht man die periläsionale Verteilung HO-1 positiver Gliazellen im Photothrombose-Modell mit dem Modell der MCAO (Koistinaho et al., 1996), so findet man bei der Photothrombose eine scharfe Abgrenzung zwischen geschädigtem und ungeschädigtem Gewebe, bei der MCAO hingegen fließende Übergänge. Der Zeitpunkt der größten HO-1 IR erscheint beim MCAO-Modell bereits nach 12-24 Stunden pl (Koistinaho et al., 1996; Maines, 1997), bei der Photothrombose erst nach 24-72 Stunden pl.

Im Modell der Photothrombose treten HO-1 positive Gliazellen bereits nach 4h pl auf, wie wir in einer vorigen Studie zeigen konnten (Bidmon et al., 1999 in press) und wie durch eine Arbeit am Modell der Hämorrhagie (Koistinaho et al., 1996) sowie nach Häm-Injektion gezeigt wurde (Turner et al., 1998). Die nach 4h pl folgende HO-1 IR legt nahe, dass Häm als Induktor der Hämoxygenase in der Rim-Region bereits zu einem frühen Zeitpunkt frei wird.

Das Auftreten HO-1 positiver Gliazellen um Blutgefäße der Rim-Region, in der das umgebende Gewebe nach 4h pl noch keine Anzeichen von Degeneration aufweist, lässt vermuten, dass infolge des Zusammenbruchs der Bluthirn-Schranke Häm zur perivaskulären HO-1 Expression führt. Dieser Befund wird zusätzlich durch biochemische Untersuchungen gestützt, die als primären Auslöser pathophysiologischer Prozesse in den die Läsion umgebenden Gefäßen oxidativen Stress ermittelt haben, der durch Häm bzw. Eisen verursacht wird (Coeroli et al., 1998; McCord, 1998).

Diese frühen und auf Blutgefäße beschränkten Prozesse lösen mehrere Reaktionen aus: Aktivierung endothelialer NOS, Umwandlung der Xanthin-Dehydrogenase zur Xanthin-Oxidase, erhöhter Arachidon-Säure Metabolismus mit Prostaglandinsynthese und dadurch gesteigerter Superoxid-Produktion, Peroxynitrit-Entstehung durch NO und Superoxid gefolgt von vermehrtem Auftreten von Hydroxyl- und Thiylradikalen. Peroxynitrit verursacht den Zusammenbruch der Bluthirn-Schranke durch Lipid-Peroxidation und Inaktivierung der Superoxid-Dismutasen über die Nitrierung von Tyrosin (Coeroli et al., 1998). Zusätzlich ist bekannt, dass NO wie auch Superoxid- und Hydroxyl-Radikale proteingebundenes Häm und Eisen freisetzen, welche die zytotoxischen Kaskaden der Haber-Weiss- und Fenton-Reaktion katalysieren. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die beobachtete Induktion glialer und neuronaler HO-1 als Folge der Produktion dieser Radikale auftritt, um das Gewebe vor oxidativem Stress zu schützen, wie es bereits für Zellkulturen dargestellt wurde (Doré et al., 1997).

Für das Photothrombose-Modell ist gezeigt worden, dass sich verletzungsbedingte Ödeme allmählich entwickeln und das Maximum 2-3d pl erreicht wird (Bidmon et al., 1998). Zwischen der fortschreitenden ödematösen Schwellung und der steigenden HO-1 Expression scheint eine zeitliche Korrelation zu bestehen: es kommt zu einer erhöhten IR von HO-1 in allen Regionen, die durch das Ödem beeinflusst werden. Ebenso verläuft die Verringerung des Ödems zeitgleich mit der Abnahme von HO-1.

In den reagierenden Astrozyten hingegen verläuft die GFAP Expression mit einer Zunahme bis 7d pl, wobei die erhöhte IR über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten bleibt. Mithilfe von Fluoreszenz-Doppelmarkierung wurden 1-2d pl rein HO-1 positiv markierte Astrozyten aufgrund ihrer Morphologie erkannt, die Astrozyten färbten sich erst im späteren Verlauf des Prozesses GFAP positiv. Während sich die HO-1 Expression der Astrozyten zwischen 3-5d pl verringerte, blieb die GFAP Expression erhalten (Bidmon et al., 1998; Schroeter et al., 1995). Daraus folgt, dass eine Kolokalisation von GFAP und HO-1 nur über wenige Tage andauert.

Die Auszählung auf der ipsilateralen Seite des Infarkts erfolgte ausschließlich an HO-1 positiven Mikroglia bzw. Astrozyten, zwischen denen quantitativ nicht differenziert wurde. Die Anzahl HO-1 positiver Oligodendrozyten, die kontralateral deutlicher auftraten, war so gering, dass ihre Erfassung nicht sinnvoll erschien. Mithilfe der Fluoreszenz-Doppelmarkierung wurde sichergestellt, dass es sich tatsächlich um die zuvor genannten Zelltypen handelt. Dabei wurden kombinierte Färbungen sowohl von HO-1 und GFAP (Astrozyten-Nachweis), HO-1 und OX-42 (CD 11b Komplementär-Rezeptor, Mikroglia-Nachweis) wie auch HO-1 und MAG (Myelin-assoziertes Glykoprotein, Oligodendrozyten-Nachweis) durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit werden HO-1 positive Oligodendrozyten gefunden, die in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurden. Dies kann verschiedene Gründe haben: Zum einen könnte es auf den von anderen Arbeitsgruppen stark verdünnt eingesetzten polyklonalen HO-1 Antikörper der Firma StressGen zurückgeführt werden (1:10.000, Matsuoka et al., 1998; 1:4.000, Matz et al., 1996; gegenüber 1:750 in der vorliegenden Arbeit), wodurch zwar immer noch größere und intensiv HO-1 exprimierende Astrozyten und Mikrogliazellen als positiv dargestellt, jedoch wesentlich schwächer HO-1 positive Oligodendrozyten nicht mehr markiert werden. Zum anderen hat auch die in der vorliegenden Arbeit verabreichte Gabe von 1,25 (OH)₂ D₃ zu einer erhöhten Aktivierung der HO-1 Expression in den Oligodendrozyten geführt.

Wie aus den Daten der Silberdegeneration hervorgeht, wurden viele Faserbahnen sekundär von der Läsion geschädigt, so dass auch die mit diesen Fasern assoziierten Oligodendrozyten (Myelinscheiden) betroffen werden. Dadurch könnte eine HO-1 Induktion in Oligodendrozyten ausgelöst werden. Die Stärke der Schädigung scheint dabei einen Einfluss auf die HO-1 Expression zu haben, da im kontralateralen Kortex mehr HO-1 positive Oligodendrozyten auftreten als ipsilateral. Nur die ipsilaterale Hemisphäre wird sowohl durch das Ödem als auch durch "Spreading depression", außerdem durch metabolische Störungen sowie starke, teils nekrotische Faseruntergänge betroffen. Dies könnte die Erklärung dafür sein, dass es ipsilateral zu keiner bzw. einer schwachen und unter dem Detektionsniveau liegenden HO-1 Hochregulation in Oligodendrozyten kommt.

Allerdings zeigt die Gabe von 1,25 (OH)₂ D₃ klar, dass kontralateral ein deutlicher Einfluss auf die Oligodendrozyten erzielt wird, da ihre HO-1 Expression stark zunimmt. Letzteres wird auch durch die Befunde der 1,25 (OH)₂ D₃ induzierten COX-2 IR gestützt. Ebenso ist aus der Literatur bekannt, dass Oligodendrozyten eine deutliche NT-3 Expression im ZNS zeigen (Heinrich et al., 1999). Da das NT-3 Gen durch 1,25 (OH)₂ D₃ reguliert wird (Neveu et al., 1994a), ist ein Einfluss von 1,25 (OH)₂ D₃ auf Oligodendrozyten zu erwarten.

Die einzige bekannte Funktion von Oligodendrozyten, welche die eisenhaltigsten Zellen des Gehirns sind, ist die Myelinproduktion (Connor and Menzies, 1996). Dabei existiert zwischen Eisengehalt und Myelinproduktion sowohl ein direkter als auch ein indirekter Zusammenhang: Eisen wird bei der Myelinproduktion direkt als Kofaktor für die Cholesterinund die Lipid-Biosynthese benötigt und indirekt für den oxidativen Metabolismus (der in den Oligodendrozyten mit einer höheren Rate als in anderen Gehirnzellen auftritt). Faktoren, wie Zytokine und Bedingungen wie Eisenmangel können den Eisengehalt in Oligodendrozyten verringern und die Empfindlichkeit von Oligodendrozyten für oxidative Verletzungen kann ein Resultat ihres eisenreichen Zytoplasmas sein. So können viele bekannte Phänomene, welche die Myelinproduktion der Oligodendrozyten verringern und deren Überleben gefährden, durch einen allgemeinen Stoffwechselweg erklärt werden. Dieser bezieht die Unterbrechungen der Eisenverfügbarkeit bzw. die intrazelluläre Kontrolle des Eisens mit ein (Connor and Menzies, 1996).

4.4.3 COX-2 Färbung

Im Modell der Photothrombose traten COX-2 positive Zellen fast ausschließlich in Neuronen auf. Eine Ausnahme bildeten die Tiere der mit 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Gruppen, die zusätzlich COX-2 positive Satellitenzellen, ihrer Form nach könnten sie Oligodendrozyten oder aber Progenitorzellen darstellen, aufwiesen. Bislang konnte jedoch noch keine Kolokalisation von COX-2 mit MAG (Oligodendrozyten), OX-42 (Mikroglia), GPx (Mikroglia) oder GFAP bzw. S100ß (Astrozyten) gezeigt werden. Dennoch ist ein Zusammenhang sehr wahrscheinlich, da 1,25 (OH)₂ D₃ die NT-3 Expression induziert, ein neutrotropher Faktor, dessen Expression charakteristisch für Oligodendrozyten ist (Heinrich et al., 1999). Bisher war nicht bekannt, dass COX-2 und HO-1 in Oligodendrozyten über 1,25 (OH)₂ D₃ aktiviert werden, eventuell könnte eine Regulierung in Oligodendrozyten über Vitamin D Rezeptoren erklärt werden, die jedoch bislang nicht beschrieben wurde.

Bekannt ist, dass die Myelinsynthese durch Vitamin D gesteuert wird (Lemire and Adams, 1992) und Multiple Sklerose (Demyelinisierung) abhängig vom geographischen Standort und somit von der Intensität der UVB-Strahlung ist, die essentiell für die dermatogene Vitamin D-Synthese ist (Hayes et al., 1997).

Die COX-2 positiven Neurone sind fast ausschließlich auf die supragranulären Laminae II und III beschränkt, eine Ausnahme bilden einige wenige Pyramidenzellen in der Lamina V. In den Kontrolltieren reflektiert diese Lokalisation die Verteilung der GABA_A-Rezeptoren (Que et al., 1998). Photothrombotische Verletzungen erhöhen ipsilateral signifikant die Anzahl COX-2 positiver Neurone, wohingegen die Dichte der GABA_A-Rezeptoren sowohl ipsi- als auch kontralateral abnimmt. Jedoch war die [³H] Muscimolbindung in der ipsilateralen Hemisphäre deutlich niedriger als kontralateral. Die Daten zeigen, dass die Veränderungen der COX-2 und GABA_A-Rezeptorenänderung ipsilateral ausgeprägter sind als kontralateral. Eventuell können auch kontralateral auftretende COX-2 Änderungen nicht ausgeschlossen werden, sie sind aber so gering, dass sie mit der Sensitivität der immunhistochemischen Methode nicht erfasst werden können. Zudem korrelierten nur in der ipsilateralen Hemisphäre niedrigere GABA_A-Rezeptordichten mit höheren OD's COX-2 positiver Neurone. Interessant ist, dass COX-2 in den supragranulären Laminae 1d pl stark hochreguliert wird, sechs Tage später finden sich dann erheblich verringerte [³H] Muscimolbindungen und weisen somit auf eine verringerte Neurotransmitter-Rezeptorbindung hin. In dieser Hinsicht könnte der durch die COX-2 Aktivität ausgelöste erhöhte oxidative Stress zu der sechs Tage später eintretenden Verringerung der Neurotransmitter-Rezeptorbindungen beitragen.

COX-2 stellt ein "immediate early gene" dar, von dem bekannt ist, dass es durch epileptische Attacken, Ödeme und "Spreading depression" induziert wird (O`Banion, 1999). Die beiden letztgenannten erscheinen früh nach der kortikalen Photothrombose und sind auf die ipsilaterale Seite beschränkt (Grome et al., 1988; Schiene et al., 1996). Da COX-2 in den von der Läsion entfernteren Regionen hoch reguliert wird und im Photothrombose-Modell für diese Regionen keine Apoptose beschrieben wurde (Braun et al., 1996), ist bislang nicht bekannt, ob der mit der COX-2 Aktivität assoziierte oxidative Stress und die möglichen Prostaglandin-Endprodukte von COX-2 (PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂, PGJ₂, TxA₂) entweder zur Neuro-Toxizität (PGE₂) oder Neuro-Protektion (PGJ₂) beitragen. Um entsprechende Aussagen treffen zu können, müssten die Endprodukte auf der Ebene einzelner Prostaglandine in den unterschiedlich betroffenen Regionen exakt charakterisiert werden.

Bei der Alzheimerschen Erkrankung zeigen sich Änderungen des Prostaglandin-Gehalts im Liquor (Montine et al., 1999). Dabei werden bei gleichbleibender Summe der COX-Aktivität im ZNS anteilige Veränderungen der Prostaglandin-Endprodukte nachgewiesen, wobei PGE₂ 5fach erhöht ist gegenüber Kontrollen, während 6-keto-PGF₁ α um 25% absinkt. Hingegen wurden in den anderen Endprodukten wie PGF₂ α PGD₂ und TxB₂ keine gravierenden Unterschiede zwischen Kontroll- und Alzheimer-Patienten gefunden. Erhöhte PGE₂-Synthese und -Sekretion wird mit der Aktivierung von Monozyten aber auch mit einer entzündlichen Aktivierung von Mikroglia assoziiert, einem Prozess, der vermutlich durch Peroxynitrit induziert wird (Landino et al., 1996). Die Quelle für 6-keto-PGF₁ α hingegen sind die Neurone (Montine et al., 1999).

Im Bezug auf die vorliegende Arbeit kann daher vermutet werden, dass trotz nahezu identischer Summenaktivität der COX-2 Mengen bei den behandelten und unbehandelten Infarkttieren keine Aussage über den eventuellen Einfluss von 1,25 (OH)₂ D_3 auf eine anteilige Veränderung der Prostaglandin-Endprodukte getroffen werden kann.

Es lassen sich bislang keine Vorhersagen über die Auswirkungen ableiten, da dazu eine Analyse der Endprodukte notwendig ist. Somit könnte nur der Nachweis veränderter Anteile bei den Prostaglandin-Endprodukten, der zur Zeit wegen unzureichend vorhandener Antikörper immunhistochemisch noch nicht möglich ist, eine gesicherte Aussage über den Einfluss von 1,25 (OH)₂ D₃ auf die COX-2 IR und damit den protektiven bzw. toxischen Charakter erbringen.

1,25 (OH)₂ D₃ zeigte keine signifikante Abnahme der COX-2 Immunoreaktivität, somit ist eine Reduktion der Superoxid Menge aus der COX-2 abhängigen Arachidonsäurestoffwechsel nicht zu erwarten. Allerdings sei darauf verwiesen, dass 1,25 (OH)₂ D₃ die COX-2 Expression nicht erhöht und die OD der COX-2 auf der ipsilateralen Seite bei den 2d/12h und 5d/1h/48h Gruppen unter denen der Lösungsmittelkontrollen lagen.

Knock-Out Mäuse, die keine COX-2 Expression zeigen, haben signifikant größere Infarkte als der COX-2 exprimierende Wildtyp (Iadecola et al., 1999). Daraus lässt sich schließen, dass den Reaktionsprodukten der COX-2 eine bisher unerwartete Rolle bei der Neuroprotektion zukommt, welche die Potenzierung von oxidativen Stress über das Superoxid an der COX-2 Aktivität bei weitem zu überwiegen scheint. Diese positiven Effekte könnten in der vasorelaxierenden Wirkung der Prostaglandine beruhen.

4.4.4 GFAP Färbung

Der für Astrozyten spezifische Marker "glial fibrillary acidic protein" (GFAP) ist ein Protein des Zytoskeletts, dass die Form und Beweglichkeit dieser Zellen moduliert. Da es normalerweise nur in 15% aller Astrozyten konstitutiv vorkommt und seine Zunahme ein empfindlicher Indikator für pathologische zerebrale Prozesse darstellt, ist GFAP auch für die durch das Photothrombose-Modell hervorgerufen Läsionen ein hervorragender Marker. Während man in nicht infarzierten Tieren meist nur gefäßassoziierte GFAP IR Astrozyten und einige in der Lamina I befindliche GFAP IR Astrozyten antrifft, sind in den infarzierten Tieren sowohl in den mit dem Lösungsmittel wie auch in den mit 1,25 (OH)₂ D₃ injizierten Tieren in den läsionsnahen wie auch in den läsionsfernen Regionen GFAP positive Astrozyten in allen Laminae deutlich erhöht. Jedoch führte eine 1,25 (OH)₂ D₃ Behandlung zu einer Verringerung GFAP positiver Astrozyten nach 48h. Da dieser Effekt bei Tieren die 1h pl behandelt wurden am ausgeprägtesten war lässt sich schließen, dass 1,25 (OH)₂ D₃ auf GFAP induzierte Faktoren wirkt, die sehr früh nach Läsionsinduktion von Relevanz sind. Hier kommen insbesondere Interleukine in Frage wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TGF- β und TNF- α , von denen bekannt ist, dass sie während der ersten 8h nach Infarkt ausgeschüttet werden. Hierbei werden IL-1 bzw. IL-1 Rezeptoren sowie IL-2 und IL-8, TGF- β und TNF- α direkt durch 1,25 (OH)₂ D₃ moduliert (Hahn et al., 1997; Saggese et al., 1993; Yacobi et al., 1996). Obwohl der Zusammenhang zwischen Interleukinmustern und GFAP noch unbekannt ist und direkte Zusammenhänge bislang nicht untersucht wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass die pro-inflammatorisch wirkenden Zytokine über inflammatorische Prozesse auch sekundär reaktive Astrozyten beeinflussen. Die Anzahl GFAP positiver Astrozyten der nach 1h pl mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tiere verglichen mit der Anzahl bei E-Öl behandelten, zeigte zum Zeitpunkt 2d pl einen suppressiven Einfluss des Hormons.

Bei den 2d Tieren, die 12h pl behandelt wurden, ist nur noch eine leichte Verringerung der GFAP positiven Astrozyten durch die Gabe des Hormons zu beobachten, bei den 5d Tieren werden annähernd gleiche Zellzahlen gefunden, unabhängig von der Behandlung. Die Ergebnisse der mit E-Öl behandelten Tiere stimmen in diesem Zeitfenster mit vorherigen Untersuchungen am Photothrombose-Modell zur Färbung GFAP positiver Astrozyten überein (Schroeter et al., 1995). Von dieser Arbeitsgruppe wurden erste GFAP positive Astrozyten innerhalb von 2d pl gefunden, die in den läsionsnahen Regionen für weitere 10 Wochen erhalten blieben, jedoch in entfernteren Regionen bereits nach 14 Tagen wieder verschwanden.

Interessant wäre es zu erfahren, über welchen Mechanismus 1,25 (OH)₂ D₃ die GFAP Expression reguliert wird. Aus Studien am Hypothalamus und Hippocampus ist bekannt, dass die Dichte des GFAP Proteins im Zytoplasma von den zirkulierenden Steroidhormonen abhängig ist (Chowen et al., 1995; Luquin et al., 1993; Mong et al., 1996). Dass im Kortex ebenfalls eine Veränderung der Anzahl GFAP positiver Astrozyten durch Steroidhormone möglich ist, konnte durch die Verabreichung von Corticosterone gezeigt werden (O'Callaghan et al., 1991b). Kurzzeitige wie auch langfristige Verabreichung dieses Steroidhormons führten zu einer 20-40% Verringerung der GFAP Expression im Kortex und im Hippocampus von gesunden Ratten. Der Versuch, durch chronische Gaben von Corticosterone prophylaktisch die GFAP Zunahme aufgrund einer durch Trauma oder Giftstoffe verursachten Hirnschädigung gering zu halten, scheiterte; so scheint die Glukocorticoid- bzw. verletzungsbedingte GFAP Expression durch unterschiedliche Mechanismen reguliert zu werden. Für das Steroidhormon 1,25 (OH)₂ D₃ ist aus der Literatur bisher keine Beeinflussung der GFAP Expression bekannt. Allerdings inhibiert 1,25 (OH)₂ D₃ die Expression von iNOS in Astrozyten in vitro und in vivo (Gacion et al., 1997), woraus zu schließen ist, dass 1,25 (OH)₂ D₃ direkt genomische Prozesse in Astrozyten reguliert, so dass die verzögerte GFAP Expression in den 2d Tieren, die 1h pl das Hormon verabreicht bekamen, vermutlich auf die zu diesem Zeitpunkt bereits erhöhte HO-1 Expression zurückzuführen ist, die als neuroprotektiv gilt. Eine denkbare Erklärung wäre, dass die durch eine erhöhte GFAP Expression angezeigten neurodegenerativen Prozesse erst zu einem späteren Zeitpunkt aufgrund des signifikant erhöhten endogenen Schutzes durch HO-1 einsetzten.

4.5 Interpretation der Zelltypbestimmung mittels Kolokalisations-Untersuchungen4.5.1 HO-1 und GFAP

Die Doppelmarkierung mit HO-1 und dem Astrozytenmarker GFAP zeigt, dass der überwiegende Anteil der HO-1 positiven Zellen Astrozyten sind. Diese beschränken sich bei Infarkttieren ausschließlich auf die ipsilaterale Hemisphäre. Interessant ist weiterhin, dass zu frühen Zeitpunkten pl (12h-1d) kaum Kolokalisationen von HO-1 und GFAP zu finden sind. Das bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt alle HO-1 positiven Zellen entweder Mikrogliazellen sind oder aber Astrozyten, die zu diesem Zeitpunkt nicht mit GFAP markiert werden können. Da jedoch ab dem 2d HO-1 positive Astrozyten auftreten, die auch GFAP positiv markiert sind, scheint diese Erklärung nicht plausibel. Allerdings ist bekannt, dass die GFAP Hochregulation meistens nach 2-3 Tagen einsetzt (Schroeter et al., 1995). Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass sich die zu Beginn der Ischämie auftretenden hypertrophen Astrozyten erst später, d.h. nach der HO-1 Expression mit der GFAP-Expression beginnen.

4.5.2 HO-1 und OX-42

Durch die Markierung mit OX-42 konnte gezeigt werden, dass auch HO-1 positive Mikrogliazellen existieren, die jedoch in deutlich geringerer Anzahl als Astrozyten zu finden sind. Diese Ergebnisse werden bestätigt durch Doppelmarkierungsversuche im Modell der traumatischen Hirnverletzung und nach subarachnoidaler Injektion von lysierten Blut, in der ebenfalls HO-1 positive Mikroglia nachgewiesen wurde (Fukuda et al., 1996).

4.5.3 HO-1 und MAG

Mithilfe des Oligodendrozytenmarkers MAG konnte gezeigt werden, dass es sich bei den kugeligen HO-1 positiven Zellen um Oligodendrozyten handelt. Dabei wurden HO-1 positive Oligodendrozyten in allen mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren zu allen Zeitpunkten pl (12h-5d) gefunden. Die Oligodendrozyten traten wesentlich häufiger als in der kontralateralen Hemisphäre auf, wo sie sowohl in den retrosplenialen Arealen wie auch in den parietalen Arealen mit Schwerpunkt in den supragranulären Laminae II und III zu finden waren. Ipsilateral erschienen HO-1 positive Oligodendrozyten fast ausschließlich in den retrosplenialen Arealen, in wenigen Fällen (bei den 5d/1h/48h Tieren) konnten auch vereinzelte Oligodendrozyten lateral der Läsion gefunden werden.

In den mit dem Lösungsmittel behandelten Tiere konnten hingegen nur einige wenige HO-1 positive Oligodendrozyten kontralateral identifiziert werden, während ipsilateral keine Oligodendrozyten gefunden wurden, so dass die Befunde in der ipsilateralen Hemisphäre gut mit den Befunden aus der Literatur übereinstimmen (Fukuda et al., 1996).
4.6 Der protektive Effekt von 1,25 Dihydroxyvitamin D₃

Grundsätzlich können neuroprotektive Substanzen auf zwei Arten wirken:

1. Die Substanz wirkt selbst protektiv:

z.B. Radikalfänger, die oxidativen Stress verhindern bzw. reduzieren.

Hierzu scheint die 1,25 (OH)₂ D₃ Wirkung nicht zu zählen, da es bislang keine klaren Anhaltspunkte für die Inhibition oxidativer Stress-Marker gibt.

2. Die Wirkung kann indirekt über Steigerung der Expression trophischer Faktoren oder protektiv wirkender Substanzen geschehen: Zur Protektion kommt es aber nur, falls das geschädigte Gewebe bzw. Organ noch zur Syntheseleistung fähig ist.

In diesen zweiten Wirkungsmechanismus ist $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ involviert, wobei die spezifische Expressionshemmung der iNOS (Garcion et al. 1997) einer Steigerung der HO-1 Expression und eventuell einer Steigerung der Expression neurotropher Faktoren wie NT-3, NGF, GDNF und TGF- β beizutragen scheint.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die aktive Form des Steroidhormons, Vitamin D_3 - das 1,25 (OH)₂ D_3 - möglicherweise eine neuroprotektive Wirkung hat. Die HO-1 Expression wird durch das Hormon signifikant erhöht, die GFAP Expression erfolgt nachweislich verzögert und verringert, die COX-2 Expression wird im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Infarkttieren nicht signifikant beeinflusst, wobei die anteilige Veränderung der Prostaglandin-Endprodukte und damit ihre Auswirkungen weiterhin offen bleiben.

Die hier gezeigten Befunde legen nahe, dass besonders die durch geschädigte Faserbahnen betroffenen Oligodendrozyten in läsionsfernen Arealen auf 1,25 (OH)₂ D₃ stark reagieren, so dass dort lokale, zellspezifische Effekte auftreten, die weiter untersucht werden sollten. Auch eine Induktion von COX-2 in Oligodendrozyten ähnlichen Satellitenzellen in 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten nicht läsionierten Tiere deutet auf einen Einfluss des 1,25 (OH)₂ D₃ hin. Dieser Einfluss führt möglicherweise zur nachgewiesenen 1,25 (OH)₂ D₃ abhängigen Expression des für Oligodendrozyten charakteristischen neurotrophen Faktor NT-3. Hier könnten besonders die Oligodendrozyten betroffen sein, die mit geschädigten aber noch nicht degenerierenden Faserbahnen assoziiert sind. Bei stark geschädigten degenerierenden Faserbahnen, z.B. im ipsilateralen Kortex, dürfte diese Reaktion entweder durch stark aktivierte Astro- bzw. Mikroglia maskiert sein oder die damit assoziierten Oligodendrozyten wurden ebenfalls so sehr geschädigt, dass eine Neusynthese von Proteinen gar nicht mehr oder nur noch unterhalb der immunhistochemischen Nachweisgrenze abläuft.

Auch aus dem Modell der EAE ist bekannt, dass 1,25 (OH)₂ D₃ eine bedeutende Rolle auf Oligodendrozyten hat, die von der Schädigung auch betroffen sind und dadurch auffallen. Zudem enthalten Oligodendrozyten das meiste proteingebundene Eisen im Gehirn, so dass eisenkatalysierende degenerative Prozesse die Oligodendrozyten besonders anfällig machen (Ishimaru et al., 1996). Dies könnte ebenfalls erklären, warum in massiv betroffenen Faserbahnen ipsilateral kaum HO-1 positive Oligodendrozyten gefunden werden, da sie möglicherweise schon funktionslos sind, wohingegen Regionen mit relativ wenigen argyrophilen "degenerativen Fasern" in entfernteren ipsilateralen und kontralateralen Hirnregionen noch eine deutliche HO-1 Färbung zeigen. Zusätzlich bleibt zu klären, ob es sich dabei tatsächlich nur um schon ausdifferenzierte Oligodendrozyten handelt oder aber um sich ausdiffenernzierende Oligodendrozyten-Progenitorzellen. Ein transienter Anstieg von Oligodendrozyten-Progenitorzellen ist zumindest für Rückenmarksläsionen bekannt (Keirstead et al., 1999).

Bei Zellkulturstudien (DLD-1, Menschl. Colorectal Adenocarcinoma-Zellen) konnte gezeigt werden, dass durch Gabe von verschiedenen NO-Inhibitoren die Expression von HO-1 mRNA signifikant erhöht werden konnte (Hara et al., 1999). Die erhöhte HO-1 Protein-Synthese ist eventuell auch über den suprimierenden Einfluss von 1,25 (OH)₂ D₃ auf NO zu erklären.

Aus der vorliegenden Arbeit geht zwar nicht hervor, über welche Faktoren die HO-1 Proteinsynthese durch Gabe von 1,25 (OH)₂ D₃ gesteigert wird, jedoch ist nach anfänglich verzögerter Expression 12h pl eine signifikante Erhöhung in allen Kolumnen 1 und 2 Tage pl, sowie in den läsionsnahen Kolumnen 5 Tage pl zu verzeichnen (Oermann et al., 1999). Die in Mikrogliazellen und Astrozyten gesteigerte Synthese führt zum vermehrten Abbau des toxisch prooxidativ wirkenden Häm, was allein bereits protektiv wirkt. Darüber hinaus kommt es jedoch auch noch zur Bildung der antioxidativ wirkenden Substanzen Biliverdin und Bilirubin. Diesen Substanzen wird eine mögliche Modulierung sowohl des Glutamat- wie auch des Dopaminstoffwechsels zugeschrieben (Roseth et al., 1995). Die Beeinflussung des Glutamat-Stoffwechsels würde sich auf die Läsion und das umgebende Gewebe eventuell günstig auswirken, da die einsetzende postläsionale Hyperexzitation beeinflusst werden könnte, die wiederum Ursache für den Kalziumanstieg im Zytosol ist. Dem drastischen Kalziumanstieg wird eine nachfolgende Deregulation Ca²⁺-abhängiger Enzyme nachgesagt, die zur Bildung freier Radikale beitragen, was wiederum zu oxidativen Stress führt. Somit wäre der Hämoxygenase nicht allein ein protektiver Effekt durch Abbau des Häm und Bildung der antioxidativen Substanzen Biliverdin und Bilirubin zuzuschreiben, sondern darüber hinaus wäre ein Schutz vor weiterer Bildung oxidativer Substanzen über die Modulierung der Glutamat-Synthese gewährleistet.

Da nur bei den 2d Tieren, die 1h pl behandelt wurden, eine signifikant verringerte GFAP-Expression im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen zu verzeichnen ist, liegt die Vermutung nahe, dass durch die bereits 1h pl erhöhte HO-1 Expression eventuell dem Gewebe durch in den Infarkt einwandernden Leukozyten ein Schutz zukommt, der mit einer verzögerten Expression des Markers für reaktive Astroglia einhergeht, welche als Anzeichen für pathologische Prozesse im ZNS gelten. Ferner könnte 1,25 (OH)₂ D₃ hier schon den frühen Anstieg der iNOS Expression in Astrozyten hemmen.

Bislang geht man davon aus, dass im Gehirn als Endprodukt der COX-2 Aktivität die PGE₂-Spiegel moduliert werden. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, dass in peripherem Gewebe sowie in Knorpel und Haut die Gabe von 1,25 (OH)₂ D₃ die PGE₂-Synthese moduliert (Boyan et al., 1999; Czarnetzki, 1989), wobei bislang davon ausgegangen wird, dass eine unphysiologisch hohe PGE₂-Produktion mit Neurotoxizität einhergeht.

Abschließend ist festzustellen, dass die 5d/1h/48h Tiere (Tab. 2, Gruppen 5 und 10) deutlich zeigen, dass eine zweite Applikation von 1,25 $(OH)_2$ D₃ nach 48h zu keiner zeitlichen Verschiebung des transienten Expressionsmusters für HO-1 (für die läsionsfernen Regionen) und COX-2 führt. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass 1,25 $(OH)_2$ D₃ keine verstärkten bzw. länger anhaltenden toxischen Effekt im Gewebe auslöst.

5 Zusammenfassung

Unter den Erscheinungsbildern neurologischer Erkrankungen nehmen Schlaganfälle den größten Anteil ein, sie führen in der Regel zu einer bleibenden Schädigung des Hirngewebes. Bei diesen ischämischen Prozessen sind mehrere Verursacher zu betrachten; so treten Gewebeschädigungen unter anderem durch oxidativen Stress auf, der durch Sauerstoff- und Stickstoffmonoxid-Radikale ausgelöst wird. Um ein Ausbreiten der Schädigung möglichst gering zu halten, ist frühzeitiges Abstoppen und Entgegenwirken der an der Ischämie beteiligten neurotoxischen Prozesse erforderlich.

Ob die aktive Form des Hormons 1,25 Dihydroxyvitamin D_3 [1,25 (OH)₂ D_3], wie aus der erfolgreichen Behandlung von Multipler Sklerose bekannt ist, nutzbringende Effekte im obigen Sinne auf das die Läsion umgebende Gewebe und die umliegenden Regionen haben kann, war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

Die regionalen sowie laminären Verteilungsmuster und Dichten der in ischämische Prozesse involvierten Marker (HO-1, die Aktivierung des Enzyms gilt bislang als neuroprotektiv, COX-2 und GFAP) wurden in dreizehn Gruppen untersucht: in Kontrolltieren ohne Infarkt, Infarkttiere mit bzw. ohne 1,25 (OH)₂ D₃ Behandlung zu unterschiedlichen Zeiten post Läsion. Die quantitative Auswertung aller Gruppen erfolgte mittels immunhistochemischer Methoden. Darüber hinaus wurde zur Identifikation der Zelltypen die Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung herangezogen.

Ein Vergleich der Verteilung positiver Zellen bei infarzierten und nicht-infarzierten, behandelten und unbehandelten Tieren ergab:

- Infarzierte Tiere zeigen neben den konstitutiv exprimierten HO-1 positiven Neuronen in der CA4 Region des Hippocampus, zusätzlich HO-1 Expression in den Gliazellen. Vergleicht man 1,25 (OH)₂ D₃ behandelte Tiere mit Lösungsmittel behandelten, so zeigt sich aufgrund des Hormons eine signifikant erhöhte Anzahl HO-1 exprimierender Gliazellen 1 und 2 Tage pl sowohl in den läsionsnahen wie auch den läsionsfernen Regionen.
- Die Verteilung COX-2 positiver Neurone die konstitutiv auch in nicht infarzierten Tieren in den supragranulären Laminae (Lamina II und III) vorkommt - wird durch einen Infarkt auf der ipsilateralen Seite in genau diesen Laminae verstärkt. Dabei scheint die Gabe von 1,25 (OH)₂ D₃ keinen Einfluss auf die Expression im Kortex zu haben. Hingegen zeigt sich in der Amygdala, zumindest in den frühen Gruppen (12h), im Vergleich zu den Kontrolltieren und den mit Lösungsmittel behandelten Tieren ipsi- wie auch kontralateral eine signifikant erniedrigte OD.
- Die Anzahl GFAP positiver Astrozyten in 2d Tieren wird durch Gabe von 1,25 (OH)₂ D₃ 1h pl in läsionsfernen Regionen signifikant verzögert. Dieser Effekt tritt in 2d Tieren, die erst 12h pl mit dem Hormon behandelt wurden, nicht mehr auf. In diesen 2d wie auch in den 5d Tieren findet man sowohl in den mit Lösungsmittel sowie mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren eine nahezu gleichbleibende Anzahl GFAP positiver Astrozyten. Mit zunehmendem Abstand von der Läsion wird jedoch die Anzahl in den 2d/12h mit 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten Tieren etwas geringer gegenüber den Kontrollen.

Aus diesen Ergebnissen ist zu folgern, dass $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ auf die Verteilung einiger in ischämische Prozesse involvierte Mechanismen Einfluss nimmt, hingegen andere unbeeinflusst bleiben. Die signifikante Steigerung der HO-1 Expression durch $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ deutet an, dass das Hormon auch im Modell der Photothrombose zur Protektion beitragen kann.

6 Literaturverzeichnis

- Agardh, C.D., Zhang, H., Smith, M.L. and Siesjö, B.K. (1991). Free radical production and ischemic brain damage: influence of postischemic oxygen tension. Int. J. Dev. Neurosci., 9:127-138
- Alam, J., Cai, J. and Smith, A. (1994). Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals. J. Biol. Chem., 269:1001-1009
- An, G., Lin, T., Liu, J., Xue, J., He, Y. and Hsu, C.Y. (1993). Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. Ann. Neurol., 33:457-464
- Andersen, P.M., Forsgren, L., Binzer, M., Nilsson, P., Ala-Hurula, V., Keranen, M.L., Bergmark, L., Saarinen, A., Haltia, T., Tarvainen, I., Kinnunen, E., Udd, B. and Marklund, S.L. (1996). Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZnsuperoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients [published erratum appears in Brain 1998 Jan;121(Pt 1): 187]. Brain, 119:1153-1172
- Anderson, G.D., Hauser, S.D., McGarity, K.L., Bremer, M.E., Isakson, P.C. and Gregory, S.A. (1996). Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. J. Clin. Invest., 97:2672-2679
- Astrup, J., Siesjo, B. and Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia the ischemic penumbra. Stroke, 12:723-725
- Bagasra, O., Michaels, F.H., Zheng, Y.M. Bobroski, L.E. Spitsin, S.V., Fu, Z.F., Tawadros, R. and Koprowski, H. (1995). Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:12041-12045
- Bamford, J. (1992). Clinical examination in diagnosis and subclassification of stroke. Lancet, 339:400-402
- Barone, F.C., Globus, M., Price, W., White, R., Storer, B., Feuerstein, G., Busto, R. and Ohlstein, E.H. (1994). Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab., 14:337-342
- Beckman, J.S. (1990). Ischaemic injury mediator. Nature, 345:27-28
- Beckman, J.S. (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. Chem. Res. Toxicol., 9:836-844
- Bergeron, M., Ferriero, D.M., Vreman, H.J., Stevenson, D.K. and Sharp, F.R. (1997). Hypoxia-ischemia, but not hypoxia alone, induces the expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in newborn rat brain. J. Cereb. Blood Flow Metab., 17:647-658
- **Bhalla, A.K., Amento, E.P. and Krane, S.M.** (1986). Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human lymphocytes and monocyte/macrophages: inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production. Cell Immunol., 98:311-322
- Bidmon, H.-J., Mayerhofer, A., Heiss, C., Bartke, A. and Stumpf, W.E. (1991). Vitamin D (Soltriol) receptors in the Choroid plexus and ependyma: their species-specific presence. Mol. Cell. Neurosci., 2:145-156
- Bidmon, H.-J. and Stumpf, W.E. (1992). Choroid plexus, ependyma and arachnoidea express receptors for vitamin D: differences between "seasonal" and "non-seasonal" breeders. Prog. Brain Res., 91:279-283
- **Bidmon, H.-J. and Stumpf, W.E.** (1994). Distribution of target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the brain of the yellow bellied turtle Trachemys scripta. Brain Res., 640:277-285
- Bidmon, H.-J. and Stumpf, W.E. (1996). Vitamin D target systems in the brain of the green lizard Anolis carolinensis. Anat. Embryol., 193:145-160
- Bidmon, H.-J., Jancsik, V., Schleicher, A., Hagemann, G., Witte, O.W., Woodhams, P. and Zilles, K. (1997a). Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. Neuroscience, 82:397-420

- Bidmon, H.-J., Oermann, E., Schleicher, A., Kato, K., Kinscherf, R., Buchkremer-Ratzmann, I., Witte, O.W. and Zilles, K. (1997b). Copper-zinc superoxide dismutase and isolectin B4 binding are markers for associative and transhemispheric diaschisis induced by focal ischemia in rat cortex. Neurosci. Lett., 228:1-4
- Bidmon, H.-J., Kato, K., Schleicher, A., Witte, O.W. and Zilles, K. (1998a). Transient increase of manganese-superoxide dismutase in remote brain areas after focal photothrombotic cortical lesion. Stroke, 29:203-211
- Bidmon, H.-J., Wu, J., Buchkremer-Ratzmann, I., Mayer, B., Witte, O.W. and Zilles, K. (1998b). Transient changes in the presence of nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunoreactivity after focal cortical lesions. Neuroscience, 82:377-395
- Bidmon, H.-J., Görcs, T.J., Oermann, E., Emde, B., Witte, O.W. and Zilles, K. (1999). Changes of postlesional heme oxygenase-1 and 2 and ist relation to iron deposition following cortical photothrombosis in rats. Society for Neuroscience, Abstract 121.2:299
- Blumberg, R.M., Taylor, D.L., Yue, X., Aguan, K., McKenzie, J., Cady, E.B., Weiner, C.P., Mehmet, H. and Edwards, A.D. (1999). Increased nitric oxide synthesis is not involved in delayed cerebral energy failure following focal hypoxic-ischemic injury to the developing brain. Pediatr. Res., 46:224-231
- Boyan, B.D., Sylvia, V.L., Dean, D.D., Pedrozo, H., Del-Toro, F., Nemere, I., Posner, G.H. and Schwartz,
 Z. (1999). 1,25-(OH)2D3 modulates growth plate chondrocytes via membrane receptor-mediated protein kinase C by a mechanism that involves changes in phospholipid metabolism and the action of arachidonic acid and PGE2. Steroids, 64:129-136
- Bö, L., Dawson, T.M., Wesselingh, S., Mork, S., Choi, S., Kong, P.A., Hanley, D. and Trapp, B.D. (1994). Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. Ann. Neurol., 36:778-786
- Branisteanu, D.D., Waer, M., Sobis, H., Marcelis, S., Vandeputte, M. and Bouillon, R. (1995). Prevention of murine experimental allergic encephalomyelitis: cooperative effects of cyclosporine and 1 alpha, 25-(OH)2D3. J. Neuroimmunol., 61:151-160
- Braun, J.S., Jander, S., Schroeter, M., Witte, O.W. and Stoll, G. (1996). Spatiotemporal relationship of apoptotic cell death to lymphomonocytic infiltration in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. Acta Neuropathol., 92:255-263
- Breslau, N.A. and Zerewekh, J.E. (1997). Pharmacology of Vitamin D preparations. 607-618, Chapter 39, In Vitamin D, Editors: Feldman, D., Glorieux, F.H. and Pike, J.W., Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto
- **Broadus, A.E., Horst, R.L., Lang, R., Littledike, E.T., Rasmussen, H.** (1980) The importance of circulating 1,25 Dihydroxyvitamin D in the pathogenesis of hypercalciuria and renal-stone formation in primary hyperparathyroidism. N. Engl. J. Med., 302:421-426
- Burke, C.R., Macmillan, K. and Boland, M.P. (1996). Oestradiol potentiates a prolonged progesteroneinduced suppression of LH release in ovariectomised cows. Anim. Reprod. Sci., 45:13-28
- Cantorna, M., Hayes, C.E. and DeLuca, H.F. (1996). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7861-7864
- Choi, B.H. (1993). Oxygen, antioxidants and brain dysfunction. Yonsei. Med. J., 34:1-10
- Choi, D.W. (1996). Ischemia-induced neuronal apoptosis. Curr. Opin. Neurobiol., 6:667-672
- **Coeroli, L., Renolleau, S., Arnaud, S., Plotkine, D., Cachin, M., Ben-Ari, N. and Charriaut-Marlangue, C.** (1998). Nitric oxide production and perivascular tyrosine nitration following focal ischemia in neonatal rat. J. Neurochem., 70:2516-2525
- Colville-Nash, P.R., Qureshi, S.S., Willis, D. and Willoughby, D.A. (1998). Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. J. Immunol., 161:978-984

- **Connor, J.R. and Menzies, S.L.** (1996). Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. Glia, 17:83-93
- Czarnetzki, B.M. (1989). Vitamin D3 in dermatology: a critical appraisal. Dermatologica, 178:184-188
- **Daval, J.L., Ghersi-Egea, J.F., Oillet, J. and Koziel, V.** (1995). A simple method for evaluation of superoxide radical production in neural cells under various culture conditions: application to hypoxia. J. Cereb. Blood Flow Metab., 15:71-77
- Dawson, V.L. and Dawson, T.M. (1998). Nitric oxide in neurodegeneration. Prog. Brain Res., 118:215-229
- Di Rosa, M., Radomski, M., Carnuccio, R. and Moncada, S. (1990). Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun., 172:1246-1252
- **Ding, A., Nathan, C.F., Graycar, J. Derynck, R., Stuehr, D. and Srimal, S.** (1990). Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-β1, -β2 and-β3 inhibit induction of macrophage nitogenoxide synthesis by IFN-γ. J. Immunol., 145:940-944
- **Doré, S, Takahashi, M., Ferris, C.D., Hester, L.D., Guastella, D. and Snyder, S.H.** (1999). Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:2445-2450
- **Dwyer, B.E., Nishimura, R., De Vellis, J. and Yoshida, T.** (1992). Heme oxygenase is a heat shock protein and PEST protein in rat astroglial cells. Glia, 5:300-305
- Ekholm, A., Katsura, K., Kristian, T., Liu, M., Folbergrova, J. and Siesjo, B.K. (1993). Coupling of cellular energy state and ion homeostasis during recovery following brain ischemia. Brain Res., 604:185-191
- Engelhorn, T., Dorfler, A., Egelhof, T., Schwab, S., Heiland, S., Sartor, K. and Forsting, M. (1998). Follow-up monitoring with magnetic resonance tomography after decompressive trephining in experimental "malignant" hemispheric infarct. Zentralbl. Neurochir., 59:157-165
- **Ewing, J.F. and Maines, M.D.** (1991). Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5364-5368
- **Ewing, J.F. and Maines, M.D.** (1993). Glutathione depletion induces heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein in rat brain. J. Neurochem., 60:1512-1519
- Ewing, J.F., Haber, S. and Maines, M.D. (1992). Normal and heat-induced patterns of expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: hyperthermia causes rapid induction of mRNA and protein. J. Neurochem., 58:1140-1149
- Faller, A. (1995). Der Körper des Menschen. Einführung in Bau und Funktion. 12. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 55 ff
- Farooqui, A.A., Haun, S.E. and Horrocks, L.A. (1994). Ischemia and Hypoxia. In: Basic Neurochemistry, edited by Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. and Molinoff, P.R. Raven Press, New York, 867-883
- Floyd, R.A. and Carney, J.M. (1992). Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. Ann. Neurol., 32:S22-S27
- **Fournier, C., Gepner, P., Sadouk, M.B. and Charriere, J.** (1990). In vivo beneficial effects of cyclosporin A and 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on the induction of experimental autoimune thyroitidis. Clin. Immunol. Immunopathol., 54:53-63
- Fu, J.Y., Masferrer, J.L., Seibert, K., Raz, A. and Needleman, P. (1990). The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. J. Biol. Chem., 265:16737-16740
- Fukuda, K., Richmon, J., Sato, M., Sharp, F.R., Panter, S.S. and Noble, L.J. (1996). Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) in glia after traumatic brain injury. Brain Res., 736:68-75

- Futaki, N., Arai, I., Hamasaka, Y., Takahashi, S., Higuchi, S. and Otomo, S. (1993). Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenan-air-pouch inflammation. J. Pharm. Pharmacol., 45:753-755
- Garcion, E., Thanh, X., Bled, F., Teissier, E., Dehouck, M., Rigault, F., Brachet, P., Girault, A., Torpier, G. and Darcy, F. (1996). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates gamma 1 transpeptidase activity in rat brain. Neurosci.Lett., 216:183-186
- Garcion, E., Nataf, S., Berod, A., Darcy, F. and Brachet, P. (1997). 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. Brain Res. Mol. Brain Res., 45:255-267
- Garcion, E., Sindji, L., Leblondel, G., Brachet, P. and Darcy, F. (1999). 1,25-dihydroxyvitamin D-3 regulates the synthesis of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. J.Neurochem., 73:859-866
- Geddes, J.W., Pettigrew, L., Holtz, M., Craddock, S. and Maines, M.D. (1996). Permanent focal and transient global cerebral ischemia increase glial and neuronal expression of heme oxygenase-1, but not heme oxygenase-2, protein in rat brain. Neurosci. Lett., 210:205-208
- Ginsberg, M.D. and Busto, R. (1989). Rodent models of cerebral ischemia. Stroke, 20:1627-1642
- **Goldberg, P.** (1974). Multiple sclerosis: Vitamin D and calcium as environmental determinants of prevalence (a viewpoint). Part 2: Biochemical and genetic factors. Int. J. Environ Studies, 6:19-27
- **Goppelt-Struebe, M., Schaefer, D. and Habenicht, A.J.** (1997). Differential regulation of cyclo-oxygenase-2 and 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) expression by glucocorticoids in monocytic cells. Br. J. Pharmacol., 122:619-624
- **Gordon, C.J.** (1994). Thermoregulatory effects of chlorpyrifos in the rat: long-term changes in cholinergic and noradrenergic sensitivity. Neurotoxicol. Teratol., 16:1-9
- Green, A.R. and Cross, A.J. (1994). Attenuation by chlormethiazole of oedema following focal ischaemia in the cerebral cortex of the rat. Neurosci. Lett., 173:27-30
- Green, S. and Chambon, P. (1988). Nuclear receptor enhance our understanding of transcription regulation. Trends Genet., 4:309-313
- Grima, G., Cuenod, M., Pfeiffer, S., Mayer, B. and Do, K.Q. (1998). Arginine availability controls the Nmethyl-D-aspartate-induced nitric oxide synthesis: involvement of a glial-neuronal arginine transfer. J. Neurochem., 71:2139-2144
- Grome, J.J., Gojowczyk, G., Hofmann, W. and Graham, D.I. (1988). Quantitation of photochemically induced focal cerebral ischemia in the rat. J. Cereb. Blood Flow Metab., 8:89-95
- Hahn, M., Lorez, H. and Fischer, G. (1997). Effect of calcitriol in combination with corticosterone, interleukin-1beta, and transforming growth factor-beta1 on nerve growth factor secretion in an astroglial cell line. J. Neurochem., 69:102-109
- Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. Biochem. Soc. Symp., 61:73-101
- Hamann, G.F., Okada, Y. and del Zoppo, G.J. (1996). Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. J. Cereb. Blood Flow Metab., 16:1373-1378
- Hamann, G.F. (1997). Acute cerebral infarct: physiopathology and modern therapeutic concepts. Radiologe, 37:843-852
- Han, J.W., Sadowski, H., Young, D.A. and Macara, I.G. (1990). Persistent induction of cyclooxygenase in p60v-src-transformed 3T3 fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3373-3377
- Hara, E., Takahashi, K., Takeda, K., Nakayama, M., Yoshizawa, M., Fujita, H., Shirato, K. and Shibahara, S. (1999). Induction of heme oxygenase-1 as a response in sensing the signals evoked by distinct nitric oxide donors. Biochem. Pharmacol., 58:227-236

- Hayes, C.E., Cantorna, M. and De Luca, H.F. (1997). Vitamin D and multiple sclerosis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 216:21-27
- Heinrich, M., Gorath, M. and Richter-Landsbergh, C. (1999). Neurotrophin-3 (NT-3) modulates early differentiation of oligodendrocytes in rat brain cortical cultures. Glia, 28:244-255
- Herschman, H.R. (1996). Prostaglandin synthase 2. Biochim. Biophys. Acta., 1299:125-140
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A. and Robinson, S.R. (1999). Astrocytes: glutamate producers for neurons. J.Neurosci.Res., 57:417-428
- Hirokawa, K., O'Shaughnessy, K.M., Ramrakha, P. and Wilkins, M.R. (1994). Inhibition of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle by retinoids. Br. J. Pharmacol., 113:1448-1454
- Holick, M.F. (1989). Vitamin D: Biosynthesis, Metabolism, and Mode of Action. 902-926 In: Endocrinology, Editor DeGroot, L.J., W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo
- **Holick, M.F.** (1991). Vitamin D: Cutaneous production and therapeutic efficacy in psoriasis. 940-948 In: Vitamin D Gene regulation, structure-function analysis and clinical application. Editors: Norman, A.W., Bouillon, R. and Thomasset, M. de Gruyter Verlag, Berlin, NewYork
- Hunter, A.J., Green, A.R. and Cross, A.J. (1995). Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? Trends Pharmacol. Sci., 16:123-128
- Iadecola, C., Xu, X., Zhang, F., el-Fakahany, E.E. and Ross, M.E. (1995). Marked induction of calciumindependent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab., 15:52-59
- Iadecola, C., Nogawa, S., Zhao, X., Niwa, K., Nagayama, M., Araki, E., Morham, S. and Ross, M.E. (1999). Vascular dysregulation and increased susceptibility to cerebral ischemic injury in mice lacking the cyclooxygenase-2 gene. Society for Neuroscience, Abstract 15.4:19
- Immenschuh, S., Stritzke, J., Iwahara, S. and Ramadori, G. (1999). Up-regulation of heme-binding protein 23 (HBP23) gene expression by lipopolysaccharide is mediated via a nitric oxide-dependent signaling pathway in rat Kupffer cells. Hepatology, 30:118-127
- **Inamdar, N.M., Ahn, Y. and Alam, J.** (1996). The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition sequences for MAF and NF-E2 transcription factors. Biochem. Biophys. Res. Commun., 221:570-576
- Inamo, J., Belougne, E. and Doutremepuich, C. (1996). Importance of photo activation of rose bengal for platelet activation in experimental models of photochemically induced thrombosis. Thromb. Res., 83:229-235
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J.C., Smith, C.D. and Beckman, J.S. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. Arch. Biochem. Biophys., 298:431-437
- Ishimaru, H., Ishikawa, K., Ohe, Y., Takahashi, A., Tatemoto, K. and Maruyama, Y. (1996). Activation of iron handling system within the gerbil hippocampus after cerebral ischemia. Brain Res., 726:23-30
- Iyer, S., Woo, J., Cornejo, M.C., Gao, L., McCoubrey, W., Maines, M.D. and Buelow, R. (1998). Characterization and biological significance of immunosuppressive peptide D2702.75-84(E --> V) binding protein. Isolation of heme oxygenase-1. J. Biol. Chem., 273:2692-2697
- **Kadowaki, S. and Norman, A.W.** (1985). Demonstration that the vitamin D metabolite 1,25(OH)2-vitamin D3 and not 24R,25(OH)2-vitamin D3 is essential for normal insulin secretion in the perfused rat pancreas. Diabetes, 34:315-320
- Kadoya, C., Domino, E.F., Yang, G.Y., Stern, J.D. and Betz, A.L. (1995). Preischemic but not postischemic zinc protoporphyrin treatment reduces infarct size and edema accumulation after temporary focal cerebral ischemia in rats. Stroke., 26:1035-1038

- Kaufmann, W.E., Worley, P.F., Pegg, J., Bremer, M. and Isakson, P. (1996). COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:2317-2321
- Keates, H.L., Cramond, T. and Smith, M.T (1999). Intraarticular and periarticular opioid binding in inflamed tissue in experimental canine arthritis. Anesth. Analg., 89:409-415
- Keirstead, H.S., Levine, J.M. and Blakemore, W.F. (1998). Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord. Glia, 22:161-170
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Saido, T.C., Ohtsuki, T., Kuwabara, K., Yagita, Y., Mabuchi, T., Yanagihara, T. and Hori, M. (1999). Species differences in fodrin proteolysis in the ischemic brain. J. Neurosci. Res., 55:643-649
- Kitamura, Y., Furukawa, M., Matsuoka, Y., Tooyama, I., Kimura, H., Nomura, Y. and Taniguchi, T. (1998). In vitro and in vivo induction of heme oxygenase-1 in rat glial cells: possible involvement of nitric oxide production from inducible nitric oxide synthase. Glia, 22:138-148
- Koistinaho, J., Miettinen, S., Keinanen, R., Vartiainen, N., Roivainen, R. and Laitinen, J. (1996). Longterm induction of haem oxygenase-1 (HSP-32) in astrocytes and microglia following transient focal brain ischaemia in the rat. Eur. J. Neurosci., 8:2265-2272
- Koprowski, H., Zheng, Y.M., Heber-Katz, E., Fraser, N., Rorke, L., Fu, Z.F., Hanlon, C. and Dietzschold,
 B. (1993). In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:3024-3027
- Koren, R., Liberman, U.A., Maron, L., Novogrodsky, A. and Ravid, A. (1989). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ acts directly on human lymphocytes and interferes with the cellular response to interleukin-2. Immunopharmacology, 18:187-194
- **Kussmaul, L., Hamprecht, B. and Dringen, R.** (1999). The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on hexose availability for the regeneration of NADPH. J. Neurochem., 73:1246-1253
- Landino, L.M., Crews, B.C., Timmons, M.D., Morrow, J.D. and Marnett, L.J. (1996). Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:15069-15074
- Lanza, F.L., Rack, M., Simon, T., Quan, H., Bolognese, J.A., Hoover, M.E., Wilson, F.R. and Harper, S.E. (1999). Specific inhibition of cyclooxygenase-2 with MK-0966 is associated with less gastroduodenal damage than either aspirin or ibuprofen. Aliment. Pharmacol. Ther., 13:761-767
- Lavrovsky, Y., Schwartzman, M., Levere, R., Kappas, A. and Abraham, N.G. (1994). Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5987-5991
- Le, W.D., Xie, W.J. and Appel, S.H. (1999). Protective role of heme oxygenase-1 in oxidative stress-induced neuronal injury. J. Neurosci. Res., 56:652-658
- Lemire, J., Adams, J.S., Sakai, R. and Jordan, S.C. (1984). 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ supresses proliferation and immunoglobulin productin by normal human peripheral blood mononuclear cells. J. Clin. Invest., 74:657-661
- Lemire, J.M. and Adams, J.S. (1992). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the passive transfer of cellular immunity by a myelin basic protein-specific T cell clone. J. Bone Miner. Res., 7:171-177
- Lemire, J. and Archer, D.C. (1991). 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Clin. Invest., 87:1103-1107
- Love, S. (1999). Oxidative stress in brain ischemia. Brain Pathol., 9:119-131
- Maines, M.D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 37:517-554

- Masaki, M., Matsushita, M. and Wakitani, K. (1998). Inhibitory effects of JTE-522, a novel prostaglandin H synthase-2 inhibitor, on adjuvant-induced arthritis and bone changes in rats. Inflamm. Res., 47:187-192
- Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Seibert, K. and Needleman, P. (1990). Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. J. Clin. Invest., 86:1375-1379
- Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith W.G., Isakson, P.C. and Seibert, K. (1994). Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3228-3232
- Massa, S.M., Swanson, R. and Sharp, F.R. (1996). The stress gene response in brain. Cerebrovasc. Brain Metab. Rev., 8:95-158
- Mathieu, C., Waer, M., Casteels, K., Laureys, J. and Bouillon, R. (1995). Prevention of type 1 diabetes in NOD mice by non hypercalcemic doses of a new strucural analog of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, KH1060. Endocrinology, 136:866-872
- Matsuoka, Y., Kitamura, Y., Okazaki, M., Sakata, M., Tsukahara, T. and Taniguchi, T. (1998). Induction of heme oxygenase-1 and major histocompatibility complex antigens in transient forebrain ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab., 18:824-832
- Matz, P., Turner, C., Weinstein, P.R., Massa, S.M., Panter, S.S. and Sharp, F.R. (1996). Heme-oxygenase-1 induction in glia throughout rat brain following experimental subarachnoid hemorrhage. Brain Res., 713:211-222
- McCord, J.M. (1998). Iron, free radicals, and oxidative injury. Semin. Hematol., 35:5-12
- McCoubrey, W.K., Huang, T.J. and Maines, M.D. (1997). Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. Eur. J. Biochem., 247:725-732
- Melcangi, R.C., Celotti, F., Castano, P. and Martini, L. (1992). Intracellular signalling systems controlling the 5 alpha-reductase in glial cell cultures. Brain Res., 585:411-415
- Melcangi, R.C., Celotti, F., Castano, P. and Martini, L. (1993). Differential localization of the 5 alphareductase and the 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in neuronal and glial cultures. Endocrinology, 132:1252-1259
- Melcangi, R.C., Galbiati, M., Messi, E., Magnaghi, V., Cavarretta, I., Riva, M.A. and Zanisi, M. (1997). Astrocyte-neuron interactions in vitro: role of growth factors and steroids on LHRH dynamics. Brain Res. Bull., 44:465-469
- Montine, T.J., Sidell, K.R., Crews, B.S., Markesbery, W.R., Marnett, L.J., Roberts, L.J. and Morrow, J.D. (1999). Elevated CSF prostaglandin E-2 levels in patients with probable AD. Neurology, 53:1495-1498
- Nataf, S., Garcion, E., Darcy, F., Chabannes, D., Muller, J. and Brachet, P. (1996). 1,25 Dihydroxyvitamin D3 exerts regional effects in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 55:904-914
- Neumann-Haefelin, T., Staiger, J.F., Redecker, C., Zilles, K., Fritschy, J.M., Mohler, H. and Witte, O.W. (1998). Immunohistochemical evidence for dysregulation of the GABAergic system ipsilateral to photochemically induced cortical infarcts in rats. Neuroscience, 87:871-879
- Neumann-Haefelin, T., Bosse, F., Redecker, C., Muller, H.W. and Witte, O.W. (1999). Upregulation of GABA_A-receptor alpha1- and alpha2-subunit mRNAs following ischemic cortical lesions in rats. Brain. Res., 816:234-237
- Neveu, I., Naveilhan, P., Baudet, C., Brachet, P. and Metsis, M. (1994a). 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes. NeuroReport, 6:124-126
- Neveu, I., Naveilhan, P., Jehan, F., Baudet, C., Wion, D., De Luca, H.F. and Brachet, P. (1994b). 1,25dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. Brain Res. Mol. Brain Res., 24:70-76

- Ni, B., Wu, X., Su, Y., Stephenson, D., Smalstig, E.B., Clemens, J. and Paul, S.M. (1998). Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. J. Cereb. Blood Flow Metab., 18:248-256
- Nishida, A., Emoto, K., Shimizu, M., Uozumi, T. and Yamawaki, S. (1994). Brain ischemia decreases phosphatidylcholine-phospholipase D but not phosphatidylinositol-phospholipase C in rats. Stroke, 25:1247-1251
- **O`Banion, M.K.** (1999). Cyclooxygenase-2: Molecular biology, pharmacology, and neurobiology. Critical. Rev. Neurobiol., 13:45-82
- O'Callaghan, J.P. (1991a). Assessment of neurotoxicity: use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. Biomed. Environ. Sci., 4:197-206
- O'Callaghan, J.P., Brinton, R. and McEwen, B.S. (1991b). Glucocorticoids regulate the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. J. Neurochem., 57:860-869
- **Oermann, E., Bidmon, H.-J., Schiene, K., Geyer, S., Witte, O.W. and Zilles, K.** (1999). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25-D₃) increases glial hemeoxygenase-1 (HO-1) expression after focal cortical photothrombotic infarcts. Society for Neuroscience, Abstract 738.1:1848
- Panahian, N., Yoshiura, M. and Maines, M.D. (1999). Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. J. Neurochem., 72:1187-1203
- Patt, A., Horesh, I., Berger, E., Harken, A. and Repine, J.E. (1990). Iron depletion or chelation reduces ischemia/reperfusion-induced edema in gerbil brains. J. Pediatr. Surg., 25:224-227
- Paxinos, G. and Watson, C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates, Sydney, Academic Press
- Pierce, J.E., Trojanowski, J.Q., Graham, D.I., Smith, D.H. and McIntosh, T.K. (1996). Immunohistochemical characterization of alterations in the distribution of amyloid precursor proteins and beta-amyloid peptide after experimental brain injury in the rat. J. Neurosci., 16:1083-1090
- Planas, A.M., Soriano, M., Rodriguez-Farre, E. and Ferrer, I. (1995). Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein following transient focal ischemia in the rat brain. Neurosci. Lett., 200:187-90
- **Pulsinelli, W.A. and Brierley, J.B.** (1979). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. Stroke, 10:267-272
- Que, M., Buchkremer-Ratzmann, I., Schiene, K., Schroeter, M., Witte, O.W. and Zilles, K. (1998). Bihemispheric reduction of GABA_A receptor binding following focal cortical photothrombotic lesions in the rat brain. Brain Res., 813:374-380
- Raz, A., Wyche, A. and Needleman, P. (1989). Temporal and pharmacological division of fibroblast cyclooxygenase expression into transcriptional and translational phases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1657-1661
- Raz, A., Wyche, A., Siegel, N. and Needleman, P. (1988). Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. J. Biol. Chem., 263:3022-3028
- Reinecke, S., Lutzenburg, M., Hagemann, G., Bruehl, K., Neumann-Haefelin, T. and Witte, O.W. (1999). Electrophysiological transcortical diaschisis after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. Neurosci. Lett., 261:85-88
- **Rogers, D.C., Wrigh, P.W., Roberts, J.C., Reavill, C., Rothaul, A.L. and Hunter, A.J.** (1992). Photothrombotic lesions of the frontal cortex impair the performance of the delayed non-matching to position task by rats. Behav.Brain Res., 49:231-235
- Romeis (1989). Mikroskopische Technik. Urban und Schwarzenberg, 17.Auflage, München, Wien, Baltimore

- Roseth, S., Fykse, E.M. and Fonnum, F. (1995). Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. J.Neurochem., 65:96-103
- Sager, T.N., Laursen, H. and Hansen, A.J. (1995). Changes in N-acetyl-aspartate content during focal and global brain ischemia of the rat. J. Cereb. Blood Flow Metab., 15:639-646
- Saggese, G., Federico, G. and Cinquanta, L. (1993). In vitro effects of growth hormone and other hormones on chondrocytes and osteoblast-like cells. Acta Paediatr. Suppl., 82:54-59; discussion 60
- Saris, N.E. and Eriksson, K.O. (1995). Mitochondrial dysfunction in ischaemia-reperfusion. Acta. Anaesthesiol. Scand. Suppl., 107:171-176
- Scheller, D.K., De Ryck, M., Kolb, J., Szathmary, S., van Reempts, J., Clincke, G. and Tegtmeier, F. (1997). Lubeluzole blocks increases in extracellular glutamate and taurine in the peri-infarct zone in rats. Eur. J. Pharmacol., 338:243-251
- Schiene, K., Bruehl, K., Zilles, K., Qu, M., Hagemann, G., Kraemer, M. and Witte, O.W. (1996). Neuronal hyperexcitability and reduction of GABA_A-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis. J. Cereb. Blood Flow Metab., 16:906-914
- Schmidt, J., Mertz, K. and Morgan, J.I. (1999). Regulation of heme oxygenase-1 expression by dopamine in cultured C6 glioma and primary astrocytes. Mol. Brain Res., 73:50-59
- Smith, J., Jenkins, A.S., Caine, A. and Boyle, I.T. (1990). The influence of calciotrophic hormones on lymphocyte transformation and interleukin-2 production in human mononuclear cells. J. Clin. Lab. Immunol., 33:49-54
- Schroeter, M., Jander, S., Witte, O.W. and Stoll, G. (1994). Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. J. Neuroimmunol., 55:195-203
- Schroeter, M., Schiene, K., Kraemer, M., Hagemann, G., Weigel, H., Eysel, U.T., Witte, O.W. and Stoll, G. (1995). Astroglial responses in photochemically induced focal ischemia of the rat cortex. Exp. Brain Res., 106:1-6
- Seed, M.P. and Willoughby, D.A. (1997). COX-2, HO NO! Cyclooxygenase-2, heme oxygenase and nitric oxide synthase: their role and interactions in inflammation. BIRAs Symposium, Saint Bartholomew's Hospital, London, 26 April 1996. Inflamm. Res., 46:279-281
- Seega, J. and Elger, B. (1993). Diffusion- and T2-weighted imaging: evaluation of oedema reduction in focal cerebral ischaemia by the calcium and serotonin antagonist levemopamil. Magn. Reson. Imaging., 11:401-409
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy K., Hauser, S., Masferrer, J.L., Perkins, W., Lee, L. and Isakson, P. (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:12013-12017
- Sharp, F.R., Massa, S. and Swanson, R.A.: (1999). Heat-shock protein protection. TINS, 22(3):97-99
- Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H., Hung, W., Kato, T. and Asayama, K. (1996). Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 55:481-490
- Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. and Molinoff, P.B. (1993). Basic Neurochemistry. Raven Press, 5th Edition, New York
- Silver, I.A. and Erecinska, M. (1994). Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. J. Neurosci., 14:5068-5076
- Simmons, M.L. and Murphy, S. (1993). Cytokines regulate L-arginine-dependent cyclic GMP production in rat glial cells. Eur. J. Neurosci., 5:825-831

Snodgrass, S.R. (1992). Vitamin neurotoxicity. Mol. Neurobiol., 6:41-73

- Snyder, S.H., Jaffrey, S. and Zakhary, R. (1998). Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. Brain Res. Brain Res. Rev., 26:167-75
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N. and Ames, B.N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. Science, 235:1043-1046
- Stryer, L. (1994). Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Stumpf, W.E. and O'Brien, L.P. (1987). 1,25 (OH)2 vitamin D3 sites of action in the brain. An autoradiographic study. Histochemistry, 87:393-406
- Sun, Y., Rotenberg, M.O. and Maines, M.D. (1990). Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain. Two HO-2 mRNAs are detected. J. Biol. Chem., 265:8212-8217
- Sutherland, M.K., Sommerville, M.J., Yoong, L.K.K., Bergeron, C., Haussler, M.R. and McLachlan, D.R. (1992). Reduction of vitamin D hormone receptor mRNA levels in Alzheimer as compared to Huntington hippocampus: correlation with calbindin-28k mRNA levels. Mol. Brain Res., 13:239-250
- Sweeney, M.I., Yager, J.Y., Walz, W. and Juurlink, B.H.J. (1995). Cellular mechanisms involved in brain ischemia. Can. J. Physiol. Pharmacol., 73:1525-1535
- Szabo, C. (1996). The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. Shock, 6:79-88
- Szabo, C. and Thiemermann, C. (1995). Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. Adv. Pharmacol., 34:113-153
- Takizawa, S., Hirabayashi, H., Matsushima, K., Tokuoka, K. and Shinohara, Y. (1998). Induction of heme oxygenase protein protects neurons in cortex and striatum, but not in hippocampus, against transient forebrain ischemia. J. Cereb. Blood. Flow. Metab., 18:559-569
- Thys-Jacobs, S., Chan, F.K.W., Koberle, L.M.C. and Bilezikian, J.P. (1997). Hypercalcalcemia due to Vitamin D toxicity. 883-901 In: Vitamin D, Editor Feldmann, D., Glorieux, F.H. and Pike, J.W., Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto
- Trakshel, G.M. and Maines, M.D. (1989). Multiplicity of heme oxygenase isozymes. HO-1 and HO-2 are different molecular species in rat and rabbit. J. Biol. Chem., 264:1323-1328
- Turner, C.P., Bergeron, M., Matz, P., Zegna, A., Noble, L.J., Panter, S.S. and Sharp, F.R. (1998). Heme oxygenase-1 is induced in glia throughout brain by subarachnoid hemoglobin. J. Cereb. Blood Flow Metab., 18:257-273
- Turner, C.P., Panter, S. and Sharp, F.R. (1999). Anti-oxidants prevent focal rat brain injury as assessed by induction of heat shock proteins (HSP70, HO-1/HSP32, HSP47) following subarachnoid injections of lysed blood. Brain Res. Mol. Brain Res., 65:87-102
- Uenohara, H., Imaizumi, S., Yoshimoto, T. and Suzuki, J. (1988). Correlation among lipid peroxidation, brain energy metabolism and brain oedema in cerebral ischaemia. Neurol. Res., 10:194-199
- van Jaarsveld, H., Kuyl, J. and Alberts, D.W. (1992). The protective effect of desferal on rat myocardial mitochondria is not prolonged after withdrawal of desferal. Basic. Res. Cardiol., 87:47-53
- Verma, A., Hirsch, D.J., Glatt, C.E., Ronnett, G.V. and Snyder, S.H. (1993). Carbon monoxide: a putative neural messenger. Science, 259:381-384
- Vigne, P., Feolde, E., Ladoux, A., Duval, D. and Frelin, C. (1995). Contributions of NO synthase and heme oxygenase to cGMP formation by cytokine and hemin treated brain capillary endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 214:1-5
- Vincent, S.R., Das, S. and Maines, M.D. (1994). Brain heme oxygenase isoenzymes and nitric oxide synthase are co-localized in select neurons. Neuroscience, 63:223-231
- Wada, K., Chatzipanteli, K., Busto, R. and Dietrich, W.D. (1998). Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat. J. Neurosurg., 89:807-818

- Wakita, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Lin, J., Miyamoto, K. and Oka, N. (1999). A cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates white matter damage in chronic cerebral ischemia. NeuroReport, 10:1461-1465
- Watson, B.D., Dietrich, W.D., Busto, R., Wachtel, M.S. and Ginsberg, M.D. (1985). Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. Ann. Neurol., 17(5):497-504
- Weber, C.M., Eke,B. and Maines, M.D. (1994). Corticosterone regulates heme oxygenase-2 and NO synthase transcription and protein expression in rat brain. J. Neurochem., 63:953-962
- Willis, D., Moore, A.R., Frederick, R. and Willoughby, D.A. (1996). Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. Nat. Med., 2:87-90
- Wilson, J.X. (1997). Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. Can. J. Physiol. Pharmacol., 75:1149-1163
- Witte, O.W. (1998). Lesion-induced plasticity as a potential mechanism for recovery and rehabilitative training. Curr. Opin. Neurol., 11:655-662
- Witte, O.W. and Stoll, G. (1997). Delayed and remote effects of focal cortical infarctions: secondary damage and reactive plasticity. Adv. Neurol., 73:207-227
- Woo, J., Iyer, S., Cornejo, M.C., Mori, N.; Gao, L., Sipos, I., Maines, M.D. and Buelow, R. (1998). Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32). Transpl. Immunol., 6:84-93
- Yacobi, R., Koren, R., Liberman, U.A., Rotem, C., Wasserman, L. and Ravid, A. (1996). 1,25dihydroxyvitamin D3 increases the sensitivity of human renal carcinoma cells to tumor necrosis factor alpha but not to interferon alpha or lymphokine-activated killer cells. J. Endocrinol., 149:327-333
- Yoshida, S., Abe, K., Busto, R., Watson, B.D., Kogure, K. and Ginsberg, M.D. (1982). Influence of transient ischemia on lipid-soluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolites in rat brain. Brain Res., 245:307-316
- Zhuo, M., Small, S., Kandel, E.A. and Hawkins, R.D. (1993). Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. Science, 260:1946-1950
- Zou, M.H., Leist, M. and Ullrich, V. (1999). Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries. Am. J. Pathol., 154:1359-1365
- Zilles, K. (1985). The cortex of the rat. A Stereotaxic Atlas, Springer Verlag, Berlin

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

1,25 (OH) ₂ D ₃	1,25 Dihydroxyvitamin D ₃
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AK	Antikörper
AS	Aminosäuren
CBF	cerebral blood flow
COX-2	Cyclooxygenase-2
d	Tage (wobei 1d exakt 24h)
DAB	Diaminobenzidin
EAE	Experimentelle-allergische-Encephalomyelitis
E-Öl	Erdnussöl
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
h	Stunden
HO-1	Hämeoxygenase-1
IE	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
IR	Immunoreaktiv
kDa	Kilo-Dalton
Μ	Molar
MAG	Myelin-assoziertes Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NDS	normal donkey serum
NGS	normal goat serum
NHS	normal horse serum
NOS	nitric oxide synthase
NO	nitric oxide
OD	optische Dichte
OX-42	CD 11b Komplementär-Rezeptor zum Nachweis von Mikroglia
pl	post Läsion
SOD	Superoxid-Dismutase
ZNS	Zentrales Nervensystem
Z/K	immunoreaktive Zellen/Kolumne
Z/Z	immunoreaktive Zellen/Zählfeld

7.2 Diagramme

Verteilung HO-1 positiver Glia in den Zählfeldern der Kolumne A



Abb. 38: Anzahl HO-1 positiver Gliazellen (+/- S.D.) in der Kolumne A zu verschiedenen Zeiten pl. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.



Verteilung HO-1 positiver Glia in den Zählfeldern der Kolumne C

Abb. 39: Anzahl HO-1 positiver Gliazellen (+/- S.D.) in der Kolumne C zu verschiedenen Zeiten pl. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.



Verteilung HO-1 positiver Glia in den Zählfeldern der Kolumne E

Abb. 40: Anzahl HO-1 positiver Gliazellen (+/- S.D.) in der Kolumne E zu verschiedenen Zeiten pl. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.



Verteilung HO-1 positiver Glia in den Zählfeldern der Kolumne F

Abb. 41: Anzahl HO-1 positiver Gliazellen (+/- S.D.) in der Kolumne F zu verschiedenen Zeiten pl. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.



Optische Dichte COX-2 positiver Zellen in der Lamina I

Abb. 42: Optische Dichte COX-2 positiver Zellen in Lamina I. Signifikanzberechnung zwischen 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten und Kontrolltieren ohne Infarkt sind mit * markiert (p<0,01).



Optische Dichte COX-2 positiver Zellen in den Laminae IV-VI

Abb. 43: Optische Dichte COX-2 positiver Zellen in Laminae IV und VI. Signifikanzberechnung zwischen 1,25 (OH)₂ D₃ behandelten und Kontrolltieren ohne Infarkt sind mit * markiert (p<0,01).



Verteilung GFAP positiver Astrozyten in den Zählfeldern der Kolumne A

Abb. 44: Anzahl GFAP positiver Astrozyten (+/- S.D.) in den Zählfeldern der Kolumne A zu verschiedenen Zeiten pl. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.



Verteilung GFAP positiver Astrozyten in den Zählfeldern der Kolumne C

Abb. 45: Anzahl GFAP positiver Astrozyten (+/- S.D.) in den Zählfeldern der Kolumne C zu verschiedenen Zeiten pl. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.



Verteilung GFAP positiver Astrozyten in den Zählfeldern der Kolumne E

Abb. 46: Anzahl GFAP positiver Astrozyten (+/- S.D.) in den Zählfeldern der Kolumne E zu verschiedenen Zeiten pl. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.



Verteilung GFAP positiver Astrozyten in den Zählfeldern der Kolumne F

Abb. 47: Anzahl GFAP positiver Astrozyten (+/- S.D.) in den Zählfeldern der Kolumne F zu verschiedenen Zeiten pl. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01) sind mit * markiert.

7.3 Antikörper-Kontrollen



Abb.48: Kontrolle der Spezifität der HO-1 Färbung. Auslassung des ersten AK, Inkubation in biotynilierten Anti-Kaninchen Antikörper (2.AK). Die Färbung zeigt keine unspezifische Markierung, lediglich eine gleichmäßige Hintergrundsfärbung.



Abb.49: Kontrolle der Spezifität der COX-2 Färbung. Auslassung des ersten AK, Inkubation in biotynilierten Anti-Maus Antikörper (rat adsorbed, 2.AK). Die Färbung zeigt keine unspezifische Markierung, lediglich eine leichte gleichmäßige Hintergrundsfärbung.



Abb.50: Kontrolle der Spezifität der GFAP Färbung. Auslassung des ersten AK, Inkubation in einem Peroxidase konjugiertem Anti-Maus Antikörper (2.AK). Die Färbung zeigt keine unspezifische Markierung, lediglich eine sehr schwache gleichmäßige Hintergrundsfärbung.

8 Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Zilles für die Bereitstellung des Themas bedanken.

Auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Schlue gilt mein besonderer Dank, da er die Betreuung der Doktorarbeit übernahm.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Bidmon möchte ich mich für die Einarbeitung in das Thema, die praktische Betreuung und für das geduldige Korrekturlesen bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Witte und seinen Mitarbeitern, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Klaus Schiene und Frau Daniela Steinhoff, verdanke ich die intensive und nette Einarbeitung in die Methode der Photothrombose.

Frau Dr. rer. nat. Nicola Palomero, Frau Dipl. Biol. Carmen Masanneck und Frau Dr. rer. nat. Barbara Emde möchte ich für ihre spontane Hilfsbereitschaft in allen Fragen und der dadurch möglichen direkten Umsetzung von Lösungsvorschlägen bedanken.

Für die jederzeit zur Verfügung stehende Hilfe bei der statistischen Auswertung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Ing. Schleicher und für die sofortige Hilfestellung bei Computerfragen, bei Herrn Dipl.-Math. Tilo Kowalski und bei Herrn Wolfgang Simon bedanken.

Der Fa. Schering möchte ich für die großzügige Gabe von 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 (ZK 131 666, Ch. Nr. WSP 94 H22B) danken.

Für die Benutzung des konfokalen Lasermikroskops möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Klinik für Gastroenterologie, Heapatolgie und Infektiologie bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und allen die mir Nahe stehen bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht und erleichtert haben.

9 Lebenslauf

9.1 Tabellarischer Lebenslauf

Name	Oermann
Vorname	Evelyn Angelique
Geburtsdatum	01.05.1971
Geburtsort	Düsseldorf
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung	1977-1981	Städt. Gemeinschafts-Grundschule in Hilden
	1981-1987	Theresienschule, Katholische Mädchen-Realschule
		in Hilden
	1987-1990	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium in Hilden

Studium04.10.1990 Beginn des Studiums der Biologie (Diplom) an der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

11.09.1996 Abgabe der Diplomarbeit mit dem Titel: "Nachweis von NO-Synthasen während der Ontogenese im Säugerhirn", erstellt am C.&O. Vogt-Institut für Hirnforschung unter der Leitung von Prof. Dr. K. Zilles.

Seit 01.10.1996 Wissenschaftliche Assistentin im C.&O. Vogt-Institut für Hirnforschung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Beginn der Promotion unter Leitung von Prof. Dr. K. Zilles und Prof. Dr. W.-R. Schlue.

9.2 Kongresse

10/96	Würzburg	Anatomische Gesellschaft
	Poster	Oermann, E., Bidmon, HJ., Schleicher, A., Mayer, B. and Zilles, K. Alterations in the area-specific density of nitric oxide synthase (NOS) containing cortical neurons during ontogeny of Balb/c mice.
5/97	Mainz	Deutsche Zoologische Gesellschaft
	Vortrag	Oermann, E., Bidmon, HJ., Schleicher, A., Mayer, B., Schwegler, H. and Zilles, K. Verteilung von Stickstoffmonoxid-Synthase und NADPH-Diaphorase positiver Neurone in zerebralen Kortex verschiedener Mäusestämme.
5/97	Olsztyn/Polen	Anatomische Gesellschaft
	Vortrag	Bidmon, HJ., Oermann, E., Schleicher, A., Kinscherf, R., Witte, O.W., Kato,K. and Zilles, K. Cortical infarcts alter the expression of superoxide dismutases (SOD).
10/97	Würzburg	Anatomische Gesellschaft
	Poster	Oermann, E., Bidmon, HJ., Schleicher, A., Schwegler, H. and Zilles, K. Unterschiede in der Packungsdichte Stickstoffmonoxid-Synthase-I (NOS-I) positiver, kortikaler Neurone bei verschiedenen Mäusestämmen.
5/98	Düsseldorf	NO-Forum der deutschsprachigen Länder
	Vortrag	Oermann, E., Bidmon, HJ., Schleicher, A., Mayer, B. and Zilles, K. Verteilung Stickstoffmonoxid positiver Neurone während der Ontogenese im zerebralen Kortex von Mäusen.
9/99	Magdeburg	2 nd Symposium on Pathology of Cerebral Neurotransmission
	Poster	Oermann, E., Emde, B., Witte, O.W., Zilles, K. and Bidmon, HJ. Cyclooxygenase-2 (COX-2): Normal cerebral distribution in rat brain and its transient increase after focal cortical photothrombosis.
9/99	Magdeburg	2 nd Symposium on Pathology of Cerebral Neurotransmission
	Poster	Bidmon, HJ., Emde, B., Oermann, E., Witte, O.W., Görcs, T.J. and Zilles, K. The time course for heme oxygenase-1 expression differs between cerebral regions affected by post lesional edema or fiber degeneration in the photothrombosis model.
10/99	Miami/USA	Society for Neuroscience
	Poster	Oermann, E., Bidmon, HJ., Schiene, K., Geyer, S., Witte, O.W. and Zilles, K. 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ (1,25-D ₃) increases glial hemeoxygenase-1 (HO-1) expression after focal cortical photothrombotic infarcts.
10/99	Miami/USA	Society for Neuroscience
	Poster	Bidmon, HJ., Görcs, T.J., Oermann, E., Emde, B., Witte, O.W., and Zilles, K. Changes of postlesional heme oxygenase-1 and 2 and ist relation to iron deposition following cortical photothrombosis in rats.

9.3 Veröffentlichungen

- Bidmon, H.-J., Oermann, E., Schleicher, A., Kato, K., Kinscherf, R., Buchkremer-Ratzmann, I., Witte, O.W. and Zilles, K. (1997). Copper-zinc superoxide dismutase and isolectin B4 binding are markers for associative and transhemispheric diaschisis induced by focal ischemia in rat cortex. Neurosci. Lett. 228: 1-4
- **Oermann, E., Bidmon, H.-J., Schleicher, A., Mayer, B., Schwegler, H. and Zilles, K.** (1998). The distribution of nitric oxide synthase-I and NADPH-diaphorase containing neurons in the cerebral cortex of different strains of mice and its association with learning and memory. Brain Res. 39: 65-75
- Oermann, E., Bidmon, H.-J., Mayer, B. and Zilles, K. (1999). Differential maturational patterns of nitric oxide synthase-I and NADPH diaphorase in functionally distinct cortical areas of the mouse cerebral cortex. Anat. Embryol. 200: 27-41
- Bidmon, H.-J., Wu, J., Palomero-Gallagher, N., Oermann, E., Mayer, B., Schleicher, A. and Zilles, K. (1999). Different nitric oxide synthase inhibitors cause rapid and differential alterations in the ligand-binding capacity of transmitter receptors in the rat cerebral cortex. Ann. Anat. 181: 345-351
- Bidmon, H.-J., Emde, B., Oermann, E., Witte, O.W., Görcs, T.J. and Zilles, K. (Exp. Neurol., in press, 2000). Heme oxygenase-1 (HSP-32) and heme oxygenase-2 induction in neurones and glial cells of cerebral regions and its relation to iron accumulation after focal cortical photothrombosis.