

Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. Sies

Ebselen senkt den Plasmaspiegel von Interleukin-6 und die gliale Expression der
Hämoxxygenase-1 nach einer fokalen photothrombotischen Hirnischämie

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Sergej Gladilin

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. H. Sies

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Jander

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Wirkung von Ebselen

1.2 Hämoxygenase-1 (HSP-32)

1.3 Fragestellung

2. Material und Methoden

2.1 Präparation & Behandlung

2.2 Bestimmung von IL-6

2.3 Immunfärbung

2.4 Auszählung und statistische Auswertung

3. Ergebnisse

3.1 IL-6 Konzentration in Plasma

3.2 Hämoxygenase-1 Expression

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literatur

7. Danksagung

8. Lebenslauf

9. Abstract

Verzeichnis der Abkürzungen:

IL-6 = Interleukin-6

IL-1 = Interleukin-1

BBB = Blut-Hirn-Schranke (blood brain barrier)

DAB = Diaminobenzidin

GFAP = Gliales fibrilläres saures Protein (glial fibrillary acidic protein)

HSP = Hitzeschockprotein (heat shock protein)

MCA = *Arteria cerebri media* (middle cerebral artery)

NGS = Normales Ziegenserum (normal goat serum)

PBS = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)

TBS = Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline)

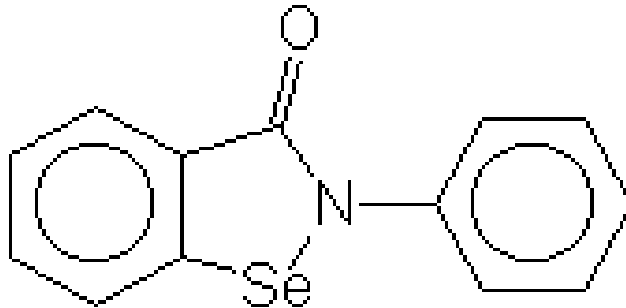
KG = Körpergewicht

FITC = Fluorescein Isothiocyanat

IgG = Immunoglobulin G

1. Einleitung

1.1 Wirkung von Ebselen

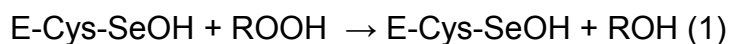


Strukturformel von Ebselen

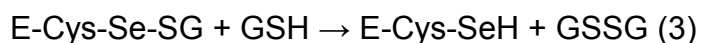
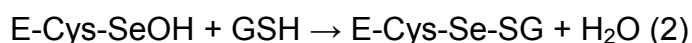
Ebselen (2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3 (2H)-on) ist eine selenorganische Verbindung. Ein besonderes Interesse hat diese Substanz nach der Entdeckung ihrer glutathionperoxydaseähnlichen Aktivität im Jahre 1984 (1) erlangt. Im Jahre 1995 wurde seine peroxynitrit-reduzierende Wirkung gezeigt (2).

Die glutathionperoxydasähnliche Wirkung von Ebselen äußert sich in der Katalyse der Hydroperoxydreaktion und verläuft in drei Schritten:

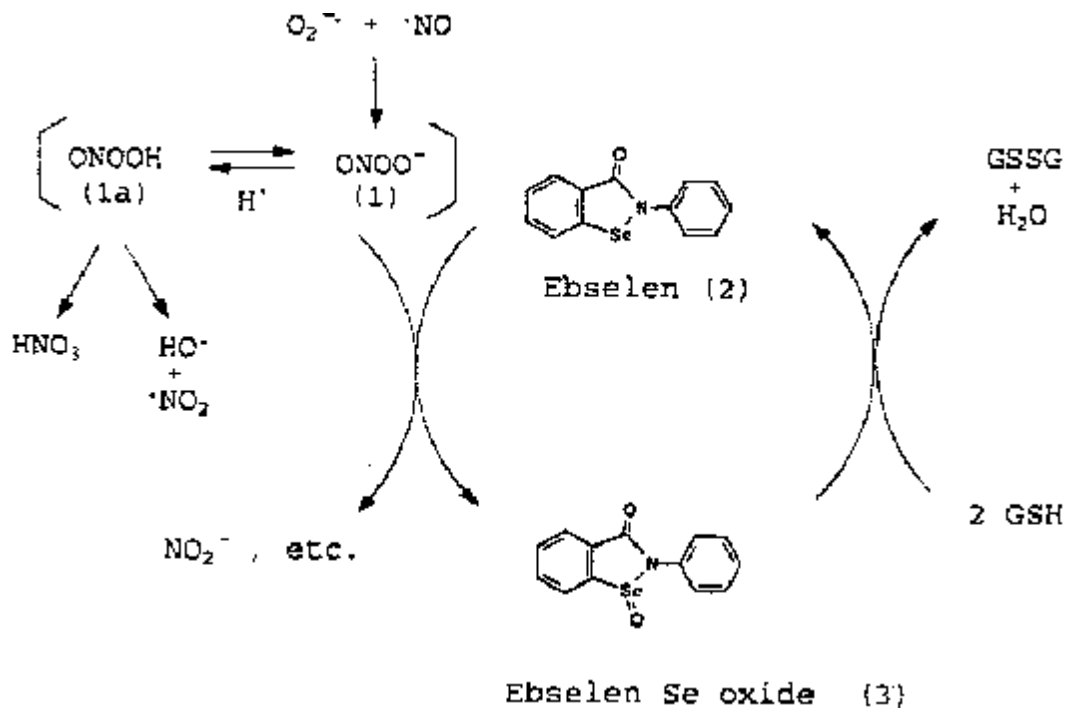
Im ersten Schritt reagiert das Hydroperoxyd mit der Bildung von seleniger Säure (E-Cys-SeOH) und entsprechendem Alkohol:



Die folgenden zwei Schritte bestehen in der sequenziellen Reduktion von Thiolen (z.B. Glutathion) zu Selenol, Wasser und Disulfid.



Die peroxynitritreduzierende Reaktion verläuft nach ähnlichem Muster:



Außerdem ist Ebselen in der Lage freie Radikale und Singulett-Sauerstoff abzufangen, allerdings sind diese Eigenschaften nur schwach ausgeprägt. So ist z.B. gezeigt worden, dass Ebselen keine protektive Wirkung auf die Lipidperoxydation durch freie Radikale besitzt. Im Gegensatz dazu ist Ebselen ein potenter Inhibitor der Lipidperoxydation, wenn diese durch Metallionen verursacht wird (7). Diese potente Inhibition wird durch die katalytische Wirkung von Ebselen auf organische Hydroperoxyde, besonders auf Hydroperoxylipide erklärt (6).

Ein anderer wichtiger Aspekt der Ebselenwirkung ist seine hohe Reaktivität mit Thiolgruppen, was zu einer Inaktivierung oder Hemmung von Enzymen führt (6).

In mehreren *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen (3 – 9) wurde gezeigt, dass Ebselen antiinflammatorische, neuroprotektive und zytoprotektive Eigenschaften besitzt. So konnte Johshita *et al* (3) zeigen, dass die Ebselengabe das

postischemische Hirnödeme bei Katzen reduziert. Dawson *et al* (5) hat gezeigt, dass die hochdosierte (30 mg/kg) Ebselengabe zu einer signifikanten (ca. 50%) Reduktion der postischemischen Hirnschädigung bei Ratten führt. In einer placebo-kontrollierten, doppelblinden Studie an Schlaganfallpatienten (31) hatten die ebselenbehandelten Patienten 1 Monat nach dem Ereignis, nach Glasgow Outcome Scale, signifikant bessere Werte als die Kontrollgruppe. In den Übersichtsarbeiten von Schewe (6) und Parnham *et al* (4) wurden antiinflammatorische und zytoprotektive Effekte von Ebselen beschrieben.

Als mögliche Wirkmechanismen werden die Inhibition der Lipidperoxydation (4), die peroxynitritreduzierende und glutathionperoxydasähnliche Wirkung (6) angeführt. Allerdings reichen die o. g. Mechanismen nicht aus, um alle beobachteten Effekte zu erklären. Als möglicher Wirkungsweg wurde die inhibitorische Wirkung von Ebselen auf die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen diskutiert (6, 9).

1.2 Hämoxygenase-1 (HSP-32)

Die Oxidation von Häm in biologischen Systemen wird von zwei Hämoxygenase-Isoenzymen katalysiert. Diese zwei Isoformen sind Produkte zweier unterschiedlicher Gene und unterscheiden sich in ihren Expressionsmustern. Während die HO-2 konstitutiv exprimiert wird, gehört die Hämoxygenase-1 zur Gruppe der induzierbaren Hitzeschock-Proteine und zeigt eine starke Induktion als Antwort auf unterschiedliche Stimuli wie z.B. Temperaturanstieg, UV-Bestrahlung, Glutathionmangel, oxidativen Stress und zerebrale Ischämie (10-13). Eine spezifische Induktion in Mikrogliazellen durch oxidativen Stress in einem Subarachnoidalblutungmodell ist beschrieben worden (14). Die Regulation der Hämoxygenase-1-Induktion erfolgt unter anderem durch IL-6 und Dopamin (15, 16). Hämoxygenase-1 und HO-2 katalysieren den Abbau freien Häms zu Biliverdin, welches dann durch die Biliverdinreduktase unter

Freisetzung von CO und Eisenionen zu Bilirubin reduziert wird (17). Die Aktivität von Hämoxigenase-1 und Hämoxigenase-2 spielt eine wichtige neuroprotektive Rolle sowohl *in vitro* (18) als auch *in vivo* (19, 20). Es konnte gezeigt werden, daß eine Induktion des Hämoxigenase-1 mit dem Anstieg des Plasmaspiegels von proinflammatorischen Cytokinen, insbesondere von IL-1 und IL-6, korreliert (15, 21). In diesem Zusammenhang ist etwa bekannt, daß der Plasmaspiegel von IL-1 und IL-6 bei zerebraler Ischämie in Menschen und Nagetieren ansteigt (22, 23).

1.3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Ebselen auf den Plasmaspiegel von IL-6 und auf die Induktion von glialer Hämoxigenase-1 im Photothrombosemodell (24) bei fokaler zerebraler Ischämie untersucht. Die Literaturangaben über die Wirkung von selenorganischen Verbindungen auf Zytokinfreisetzung sind zum Teil widersprüchlich. Sie reichen von einer Induktion (36, 37) bis zu einer Inhibition (38, 39). Um die Frage über die mögliche Auswirkung von Ebselen auf die Zytokinfreisetzung zu klären, haben wir uns entschlossen, die Effekte von Ebselengabe im Rattenmodell zu untersuchen. Dabei haben wir IL-6 als typischen Vertreter der proinflammatorischen Zytokine und die Induktion von Hämoxigenase-1 als Maß des oxidativen Stress benutzt. Das Photothrombosemodell indirekter Hirnverletzung, in mehreren pharmakologischen Studien benutzt (25), erreicht eine Okklusion von kortikalen Endästen der *Arteria cerebri media* (MCA), was bei den Menschen zu klinischen Symptomen führt, die bei kleineren multifokalen Läsionen beobachtet werden (senso-motorische Ausfälle, Sprachstörungen). Im Gegensatz zu dem stärker invasiven Modell eines vollständigen MCA-Verschlusses führt die kortikale Photothrombose zu kleineren kortikalen Läsionen ohne primäre Verletzung von subkortikalen Strukturen. Dies

erlaubt eine sekundäre Ausbreitung von Verletzungen *via* Faserdegeneration auf Areale, die von einer sekundären Antwort betroffen sind (27-29).

2. Material und Methoden

2.1 Präparation & Behandlung

Männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 und 300 g wurde nach Anästhesie durch 2,0% Enfluran in einem Gemisch von O₂/N₂O (30%/70%), das den Tieren über eine Gesichtsmaske appliziert wurde, eine photothrombotische fokale Hirnverletzung nach der Methode von Watson et al (24) in der Modifikation von Schiene et al (30) gesetzt. Dazu wurde die linke femorale Vene katheterisiert und die Ratten in einem stereotaktischen Rahmen plaziert; schließlich wurde die Kopfhaut mit einem Skalpell inzidiert und zur Seite gezogen, um den Schädel frei zu legen. Ein fiberoptisches Kabel (Durchmesser 1,5 mm) wurde auf dem Schädel 3,5 bis 4,0 mm posterior zum Bregma und 3,5 bis 4,0 rechts lateral von der Mittellinie positioniert, so daß der Lichtkegel über dem Hinterpfotenbereich der somatosensorischen Hirnrinde lag. Sodann wurde Bengalrosa (10 mg/ml in 0,9% (w/v) NaCl) über den *Vena femoralis*-Katheter injiziert und der Schädel über das fiberoptische Kabel bestrahlt: Das Licht (150 W Kaltlicht; Schott, Mainz) wurde für 20 min eingeschaltet, und während der ersten 2 min wurde langsam die Gesamtdosis Bengalrosa (1,3 mg per 100 g KG) injiziert. Die rektale Temperatur der Tieren wurde dabei kontinuierlich kontrolliert und mit Hilfe einer Wärmeplatte konstant bei $37,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$ gehalten.

Dreißig Minuten nach Beginn der Photothrombose wurden die Tiere entweder mit Ebselen (50 mg/kg; gelöst in 1% Tylose in PBS (pH 7,4)) oder mit Trägerlösung (1% Tylose) über Schlundgabe (gavage) behandelt. Behandlungskontrolle („sham-control“) - Tiere wurden identisch behandelt, mit dem Unterschied, daß diese Tiere nicht bestrahlt wurden.

Plasmaproben für die Cytokinbestimmung wurden mit heparinisierten Spritzen zu festgelegten Zeitpunkten (siehe 2.2) entnommen. Das Probenvolumen lag

zwischen 200 und 400 µl. Die Proben zum Zeitpunkt 0 h wurden dem Femoraliskatheter, die Proben am Tag 2 oder 7 der *Vena cava inferior*, alle anderen Proben unter Inhalationsnarkose den Schwanzvenen entnommen.

Die behandelten Tiere sind in 4 Gruppen unterteilt worden. Gruppe 1 (n=9) diente als „sham-control“ und bekam 1% Tylozelösung, Gruppe 2 (n=8) diente ebenfalls als „sham-control“, bekam aber 50 mg Ebselen in 1% Tylozelösung über den Schlund. Die Gruppe 3 bekam eine Photothrombose und 1% Tylozelösung („vehicle control“), und die Gruppe 4 (verum) ebenfalls eine Photothrombose und 50 mg/Kg Ebselen (gelöst in 1% Tylose) über den Schlund.

2.2 Bestimmung von IL-6

Blutproben für die IL-6 Bestimmungen wurden zu den Zeitpunkten 0 (unmittelbar vor Bengalrosa – Injektion), 8, 24 und 48 Stunden abgenommen, bei + 4°C und 10.000 U/min für 10 min zentrifugiert und danach bei – 80°C bis zur Messung aufbewahrt. Der IL-6 Plasmaspiegel wurde mit einem ELISA assay (Endogen, USA) gemessen.

2.3 Immunfärbung

Für die immunhistochemischen Analysen wurden die Tiere am Tag 2 *post lesionem* mit Pentobarbital (50 mg/KG) anästhesiert, die Blutentnahme erfolgte aus der *Vena cava inf.* Die Ratten wurde transkardial mit NaCl 0,9% - Lösung mit 5.000 I.E. Heparin (Liquemin, Hoffmann-La Roche, Basel) perfundiert, danach mit 300 ml Zamboni Lösung (4% Paraformaldehyd, 15% gesättigte Pikrinsäure in 100 mM PB, pH 7,4) pro Tier. Die Hirne wurden dem Schädel entnommen, über Nacht in der Zambonis Lösung nachfixiert, danach in die 30% Saccharose in PBS (pH 7,4) für 48 Stunden eingetaucht, anschließend auf Trockeneis eingefroren und mit einem Kryotom (Frigocut, Leica, Deutschland) geschnitten. Freischwimmende 60 µm dicke

Schnitte wurden 4 mal mit PBS (10mM, pH 7,4) gewaschen. Die endogene Peroxydase wurde durch das Inkubieren der Schnitte in PBS mit 3% H₂O₂ (30 Minuten) inhibiert. Nach 2 weiteren Spülungen mit PBS wurden die Schnitte zweimal (je 15 Minuten) mit Tris-gepufferten Kochsalzlösung (0,05 M TBS, pH 7,4) gespült und danach in 10% normalen Ziegen Serum (NGS, Vectastain, Camon, Wiesbaden) in TBS mit 0,2% Triton-X-100 für 30 Minuten inkubiert.

Danach folgte eine Inkubation von Hirnschnitten in primärem Antiserum (48 Std bei 4° C) gegen Hämoxygenase-1 (Stress Gen, Canada, Endverdünnung mit 10 mM PBS, pH7,4, 1:750). Die Schnitte wurden viermal mit TBS gespült und über Nacht bei 4° C mit biotiniertem anti-rabbit IgG (Vectastain; Endverdünnung mit 10 mM PBS, pH7,4, 1:200) inkubiert. Nach 4 weiteren Spüllungen mit TBS wurden die Schnitte für 90 Minuten in AB - Komplex (Vectastain), verdünnt 1:200 in TBS, inkubiert, gespült und die Antikörperbindung wurde mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Sigma, Deisenhofen), verdünnt mit Tris-HCl Puffer (50 mM, pH 7,6) mit 0,003% H₂O₂, visualisiert. Die Schnitte wurden gespült, mit Chromalaungelatine auf Objektgläsern fixiert und unter Verwendung von DePeX (Fluka) eingebettet.

2.4 Auszählung und statistische Auswertung

Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop untersucht und die immunreaktiven kortikalen Gliazellen innerhalb der festgelegten topografischen periläsionalen Hirnregionen (Abb. 2) wurden gezählt. Die periläsionalen Hirnregionen wurden in Kern („core“), Absetzungszone („demarcational zone“), Saum („rim“) und periläsionale Hirnrinde („perilesional cortex“) aufgeteilt (Abb. 2). Vier Schnitte der Gruppen 1, 2 und 3 (sham- und vehicle-control) und 7 Schnitte der Gruppe 4 („verum“: Photothrombose-Läsion mit Ebselengabe) wurden ausgezählt. Der Abstand zwischen den Schnitten bei jedem Tier betrug 120 – 180 µm um eine Doppelzählung

von Zellen auszuschließen. Die Zählfelder (Feldfläche $3,61 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) wurden in einer reproduzierbaren Weise (wie in der Abb. 2 gezeigt ist) plaziert. Die Daten wurden statistisch mit Hilfe von ANOVA- und Student's t-Test ausgewertet.

Hämoxygenase-1-positive Zelltypen wurden mit Hilfe der Hämoxygenase-1-Colokalisation unter Verwendung eines Astrogliamarkers (gliales fibrilläres saures Protein (GFAP)) charakterisiert. Hierzu wurden entweder primäre monoklonale Antikörper (Boehringer, Mannheim, Endverdünnung 1:25 mit 10 mM PBS, pH 7,4) oder der mikroglia-spezifische Marker OX 42 (Serotec, Biozol, Eiching, Endverdünnung 1:100 mit 10 mM PBS, pH 7,4) benutzt. Der Spül- und Inkubationsvorgang erfolgte, wie im Abschnitt 2.3 (Immunfärbung) beschrieben. FITC-markiertes anti-Maus IgG (Dianova, Hamburg, Endverdünnung 1:150 mit 10 mM PBS, pH 7,4) wurde als Sekundärantikörper benutzt, wobei die Hämoxygenase-1-Detektion mit Cy³-markiertem anti-Kaninchen IgG (Dianova, Endverdünnung mit 10 mM PBS, pH 7,4, 1:200) durchgeführt wurde. Die Schnitte wurden unter konfokalem Laser-Scannermikroskop (Leica, Bensheim) untersucht. Nichtspezifische Antikörperbindung wurde kontrolliert, indem die Schnitte entweder ohne Primärantikörper oder mit Kaninchen - IgG (Sigma, Deisenhofen; I-8140) in einer Verdünnung von 1 $\mu\text{g/ml}$ an Stelle der Primärantikörpern behandelt wurden.

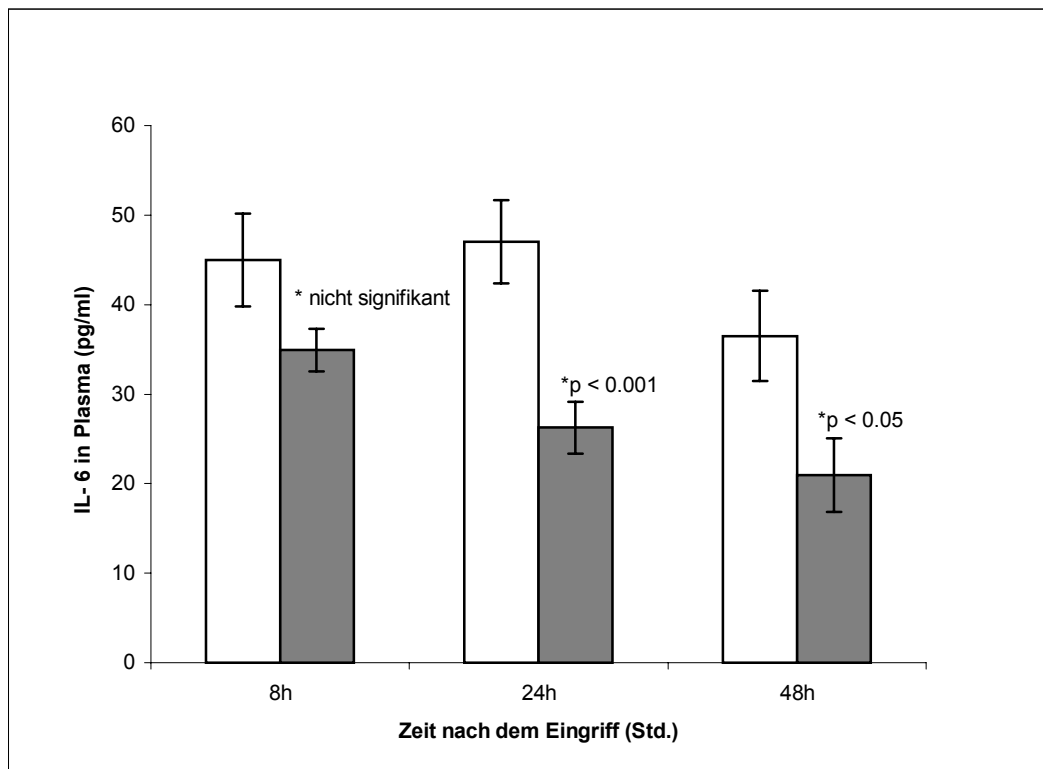
3. Ergebnisse

3.1 IL-6 Konzentration in Plasma

Die Plasmakonzentrationen von IL-6 lagen bei sham-operierten Ratten (Gruppen 1 und 2) sowohl vor als auch nach dem Eingriff unterhalb des messbaren Bereichs. Bei Ratten mit Photothrombose (Gruppen 3 und 4) fanden wir 8, 24 und 48 Stunden nach dem Eingriff erhöhte IL-6 Plasmakonzentrationen. Die Photothrombose-Tiere mit Ebselenbehandlung (Gruppe 4) hatten einen signifikant niedrigeren IL-6 Plasmaspiegel bei 24 ($P < 0,001$) und 48 Stunden ($P < 0,05$) als die Kontrollratten (Gruppe 3) (Abb. 1).

Abb. 1 IL-6 Plasmaspiegel nach photothrombotischer Läsion.

Photothrombotisch läsionierte Tiere (Gruppe 3; weiße Säule) zeigten hohe IL-6 Plasmaspiegel. Photothrombotisch läsionierte und ebelenbehandelte Tiere (Gruppe 4; schwarze Säule) hatten einen signifikant niedrigeren IL-6 Plasmaspiegel zu den Zeitpunkten 24 ($P < 0,001$) und 48 Stunden ($P < 0,05$). 8 Stunden *post lesionem* war der Unterschied im IL-6 Plasmaspiegel in beiden Gruppen nicht signifikant.



3.2 Hämoxygenase-1 Expression in Gliazellen

Um die postläsionalen Veränderungen auf einer topographisch vergleichbaren Weise zu beschreiben, haben wir definierte zerebralen Regionen benutzt (27, 29). Zu diesen Regionen, die eindeutig durch Photothrombose beeinflusst werden, zählten core (Kern), demarcation zone (Absetzungszone), rim (Saum), perilesional cortex (periläsionale Hirnrinde) (Abb. 2) und die entsprechenden Bezirke in der contralateralen Hemisphäre. In Hirnschnitten von „sham-control“ - Ratten, sowohl mit als auch ohne Ebelenbehandlung, wurden Hämoxygenase-1 immunreaktive Neuronen beiderseits in Hippokampusregionen gefunden, wo ihre Ausbreitung auf *Gyrus dentatus* und CA3-Region begrenzt war. In Hippokampus oder in der Hirnrinde sind keine Hämoxygenase-1 positive Gliazellen entdeckt worden.

Nach der kortikalen Photothrombose kam es am Tag 2 zu einer deutlichen Hochregulation von Hämoxygenase-1-positiven Gliazellen in den kortikalen Schichten der betroffenen Hemisphäre, im ipsilateralen *Corpus callosum* und in den oberen Schichten des ipsilateralen Hippokampus.

Hämoxygenase-1-immunreaktive Gliazellen bildeten mit ihren Fortsätzen ein dichtes Netz um den Photothrombosekern herum als Ausdruck einer glialen Narbenbildung. Kolokalisationsuntersuchungen mit Hilfe vom astrozytenspezifischen Marker GFAP haben gezeigt, dass die meisten Hämoxygenase-1-positiven Zellen Astrozyten sind, wobei eine deutlich geringere Zahl von Mikrogliazellen durch Kolokalisation mit OX 42 (Abb. 3A – 3G) identifiziert wurden. Außerdem hat die Kolokalisation gezeigt, dass in der Region der periläsionaler Hirnrinde, die als Absetzungszone definiert wurde, nur die Gliazellen eine Hämoxygenase-1-Expression vorweisen konnten. Diese Zellen sahen groß und geschwollen wie hypertrophierte Astrozyten aus. Sie unterschieden sich eindeutig von kleineren,

rundlichen, degenerierenden „grünen“ Zellen und kleineren, rundlichen, eindringenden Hämoxxygenase-1-positiven Lymphozyten in der Kernregion (Abb. 3B und 3B‘). In der unmittelbaren Nähe von Absetzungszone innerhalb des Saums waren die Hämoxxygenase-1-positiven Astrozyten gleichmäßig über alle kortikalen Schichten verteilt. Viel weniger Hämoxxygenase-1-positive Astrozyten waren in mehr entfernten periläsionalen Regionen zu sehen, die meisten davon waren in supragranulären kortikalen Schichten zu sehen (Abb. 3A und 3C). Innerhalb des Saumes und der entfernten periläsionalen Bereichen lagen viele Hämoxxygenase-1-positive Zellen in unmittelbare Nähe von intrakortikalen Blutgefäßen (Abb. 3B, 3E und 3F), was auf Ihre Rolle bei der Bildung der Blut-Hirn-Schranke schließen lässt. Im Gegensatz zu den distalen ventro-lateralen Regionen, die durch MCA durchblutet werden, zeigten die medial vom Kern liegenden Regionen eine hohe Zahl an Hämoxxygenase-1-positiven Gliazellen, allerdings nur im Saumbereich. In granulären retrosplenalen Hirnrinderegionen, die aus dem System der *Arteria cerebri anterior* versorgt werden, gab es kaum Hämoxxygenase-1-positive Zellen (Abb. 3D).

Abb. 2 Schematische Darstellung von topographischen Hirnregionen, die bei der Auswertung benutzt wurden.

A und B – Saum: C und D – periläsionale Hirnrinde (C, Region der *Arteria cerebri media*; D, Region der *fissura renalis*). Siehe Ref. (27, 29).

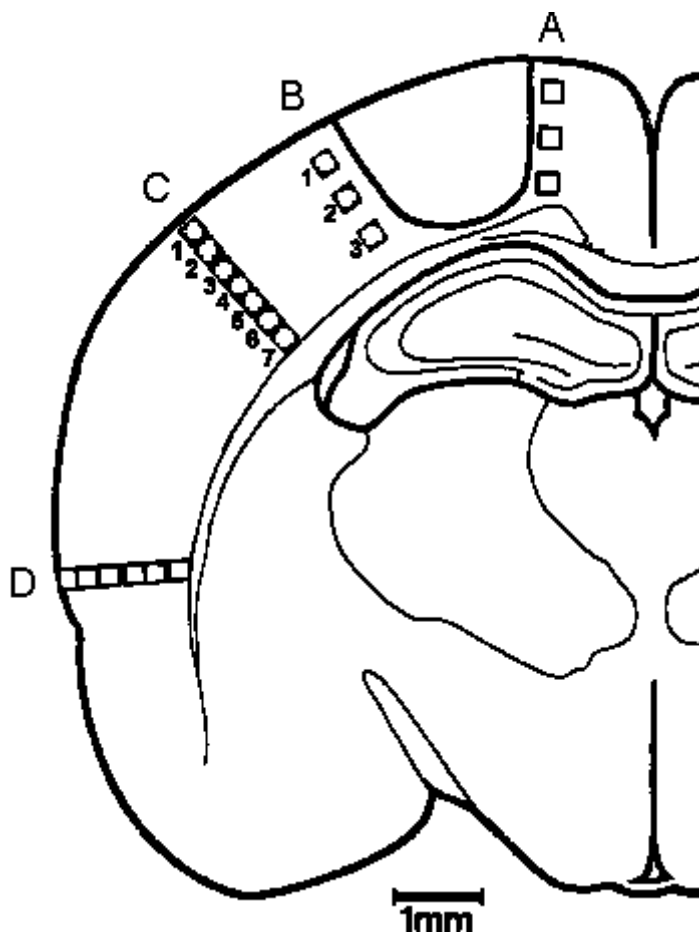
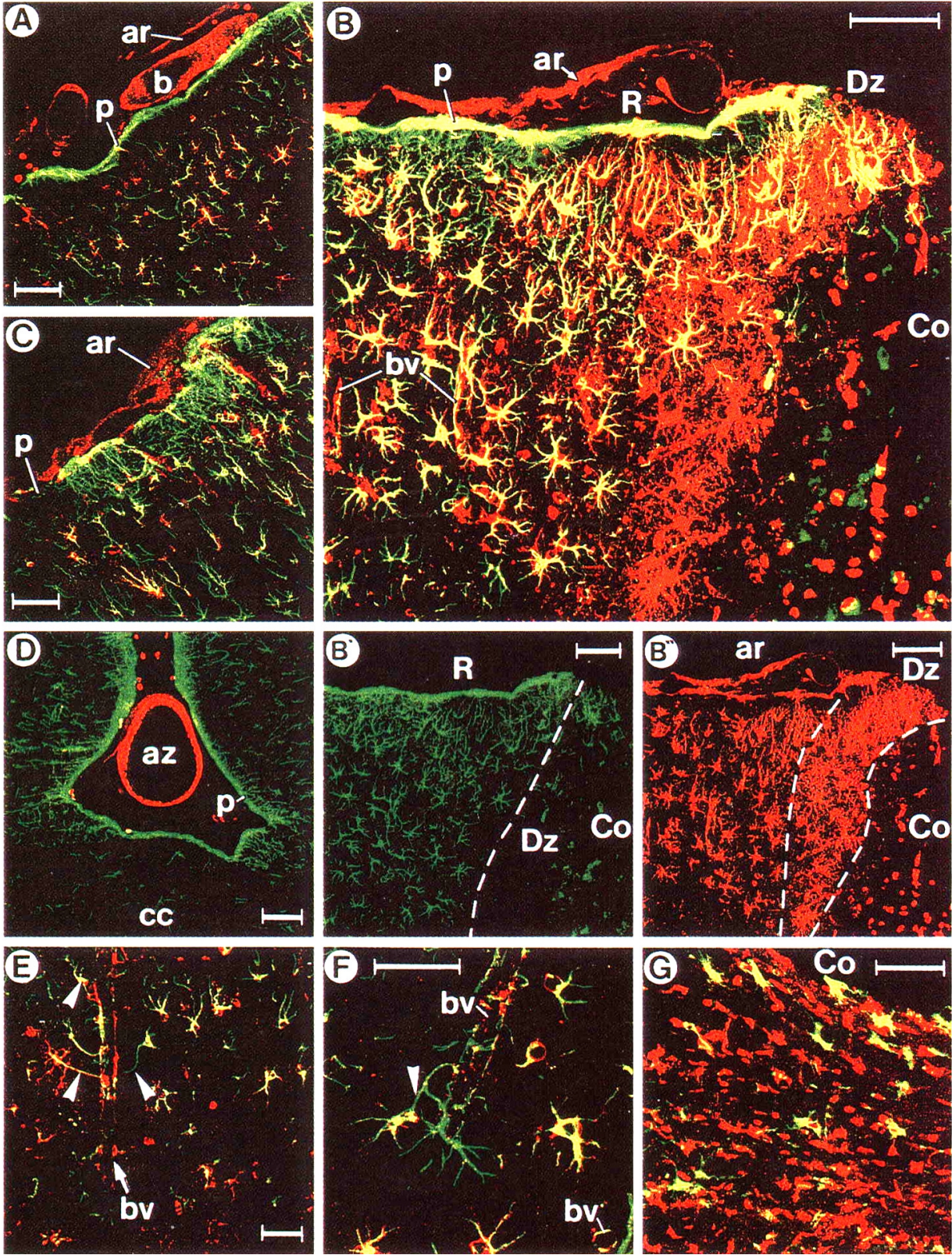


Abb. 3 Expression der Hämoxigenase-1 nach fokaler photothrombotischer Hirnischämie.

Verteilung der Hämoxigenase-1 (rot) und astrozytenspezifischen GFAP (grün, A - F) oder mikroglia-spezifischen OX 42 (grün, G) am Tag 2 nach kortikaler Photothrombose zeigt innerhalb der periläsionalen Hirnrinde eine vorherrschende Kolo-kalisation von Hämoxigenase-1 in Astrozyten oder Mikroglia (gelb). In unmittelbarer Nähe des Läsionskerns (Co in B) sieht man kleine Hämoxigenase-1-positive rote oder grüne Fragmente der astrozytären Zellen. Der Läsionskern ist von der Absetzungszone (Dz) umrundet, die hypertrophierte Astrozyten enthält, die ausschließlich Hämoxigenase-1-positiv sind und eine hohe Dichte in allen kortikalen Schichten zeigen (B, B', B''). Innerhalb des periläsionalen Saums sieht man, dass viele Astrozyten auch Hämoxigenase-1-positiv sind, mit höchster Dichte in oberen supragranulären Schichten, direkt unter der pialen Oberfläche (P); in den unteren infragranulären Schichten war die Dichte geringer (B – B''). In Hirnhäuten sah man eine Kolo-kalisation von GFAP und Hämoxigenase-1 in *pia mater*, während Arachnoidea (ar) und alle arachnoidalen Blutgefäße ausschließlich Hämoxigenase-1 Expression zeigten (A - D). Die Fortsätze der Hämoxigenase-1-positiven Astrozyten haben engen Kontakt mit der Hämoxigenase-1-positiven Wand der intrakortikalen Blutgefäße (bv, B, E, F). Die distalen Regionen, die den Reihen C oder D in Abb. 2 entsprechen, zeigen einen regionsspezifischen Unterschied in der Anzahl von GFAP-positiven Astrozyten, von denen nur eine bestimmte Anzahl in den supragranulären Schichten auch Hämoxigenase-1-positiv ist (gelb, A, C). (D) Die interhemisphärische Spalte zwischen den läsi-onierten (linken) und nicht-läsi-onierten (rechten) Hemisphären. Hier sieht man in der granulären retrosplenalen Hirnrinde nur wenig Hämoxigenase-1-positiv e Gliazellen, aber die Wand von der pericallosalen *Arteria azygos* (az) zeigt eine deutliche positive Immunreaktion für Hämoxigenase-1.

E und F: Blutgefäßassoziierte Hämoxxygenase-1-positive Gliazellen in distalen
Regionen G. Hämoxxygenase-1-positive Mikroglia (gelb) in der Nähe von
Läsionskern. Cc – Corpus callosum
Maßstab: 100 µm

Abb. 3 Expression der Hämoxxygenase-1 nach fokaler photothrombotischer Hirnschämie.

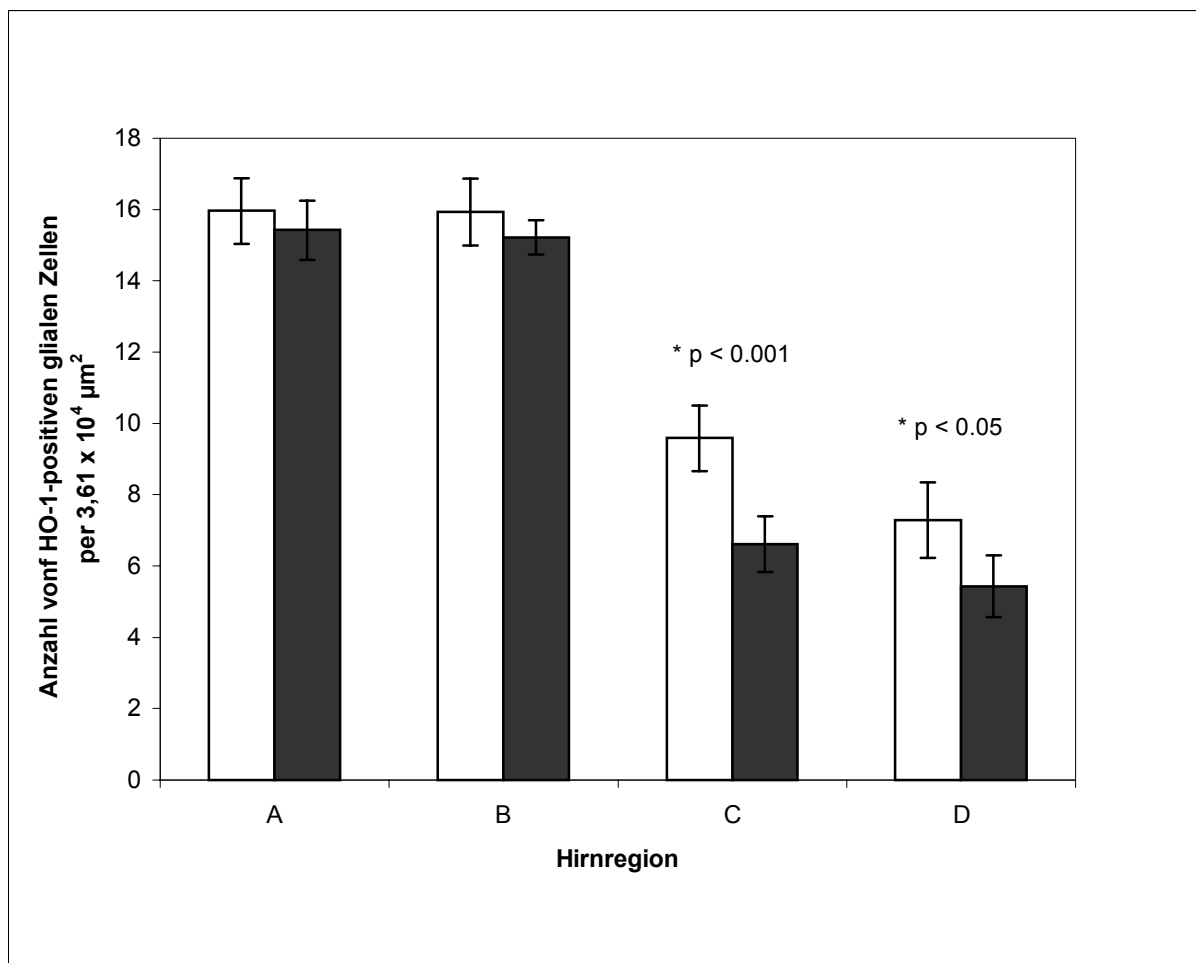


Zusätzlich zu der intrakortikalen Hochregulation von Hämoxigenase-1-positiven Zellen innerhalb der Hirnrinde kam es auch zu einer deutlichen Hämoxigenase-1-Hochregulation in der meningealen Hirnhaut vor allem in der Arachnoidea, wo auch die Blutgefäßwände stark Hämoxigenase-1 immunreaktiv waren (Abb. 3A-3D). Am siebten Tag *post lesionem* gab es sowohl bei ebselenbehandelten als auch bei Kontrolltieren in den entfernten periläsionalen Regionen keine Hämoxigenase-1-positive Astrozyten oder Mikrogliazellen mehr; in kernnahen Anteilen vom Saum konnte man noch einzelne Hämoxigenase-1-positive Astrozyten finden (nicht abgebildet). Es zeigt, dass die astrogliale und mikrogliale Hämoxigenase-1-Hochregulation ein vorübergehendes Phänomen darstellt, das man auch in ähnlichen experimentellen Modellen sehen kann.

Quantitative Auszählung von Hämoxigenase-1-immunoreaktiven Gliazellen innerhalb von bestimmten periläsionalen Hirnrinderegionen (für die Beschreibung der Zählmethode siehe 2.4) zeigte sowohl bei ebselenbehandelten Tieren als auch bei Kontrolltieren mit photothrombotischer Läsion keine Unterschiede in der Anzahl von Hämoxigenase-1-positiven Zellen innerhalb der Saumregion (Abb. 4). Aber in den supragranulären Schichten der periläsionalen Hirnrinde, die als Reihen C und D bezeichnet sind (Abb. 2), zeichnete sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen ab. Ebselenbehandelte Tiere hatten signifikant weniger (20 – 25%) Hämoxigenase-1-immunoreaktive Gliazellen als solche, die nur mit Trägerlösung behandelt wurden; bei ebselenbehandelten Tieren fanden wir pro Zählfeld 6,6 und 5,4 Zellen für Regionen C und D, wohingegen bei der Kontrollgruppe 9,6 und 7,3 Zellen pro Zählfeld in den entsprechenden Regionen zu finden waren (siehe Abb. 4).

Abb. 4 Anzahl von Hämoxigenase-1- positiven Gliazellen in unterschiedlichen Hirnregionen 48 Stunden nach Photothrombose (topographische Lokalisation siehe Abb. 2).

Ebselenbehandelte (Gruppe 4; schwarze Säule) und nicht ebselen-behandelte Tiere (Gruppe 3; weiße Säule) mit photothrombotischer Läsion zeigten keinen Unterschied in der Anzahl von Hämoxigenase-1-positiven Gliazellen im Saum. In den supra-granulären Schichten der periläsionaler Hirnrinde (Kolumnen C und D in Abb. 2) konnte man deutliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen feststellen, wobei ebselenbehandelte Tiere signifikant weniger (20 – 25%) Hämoxigenase-1-positiv Gliazellen hatten, als die Trägerkontrollgruppe. In beiden Gruppen von nicht-läsionierten Tieren gab es keine Hämoxigenase-1 Induktion in Gliazellen (Ergebnisse nicht gezeigt).



4. Diskussion

Die klinischen Vorteile der frühen Ebselenbehandlung bei einem akuten ischämischen Schlaganfallereignis wurde sowohl für Menschen (31) als auch für Nager (5, 32; für Übersicht siehe (9)), nachgewiesen. In der aktuellen Untersuchung verabreichten wir 50 mg Ebselen per kg Körpergewicht 30 min nach dem Auslösen einer fokalen cerebralen Ischämie; diese Zeitspanne erscheint auch für klinische Bedingungen realistisch, vorausgesetzt es stehen gut organisierter Rettungsdienst und diagnostisch-therapeutische Einrichtungen (z.B. „stroke unit“) zur Verfügung. Denkbar wäre auch eine primäre Gabe von Ebselen durch den Notarzt vor Ort, da die Substanz nebenwirkungsarm ist.

Die Expression von Hämoxigenase-1 in Gliazellen wurde als Marker für oxidativen Stress und darauf folgende Hirngewebsbeschädigung benutzt. Zusätzlich zu quantitativer Auszählung von Hämoxigenase-1-positiven Zellen, wurde eine Bestimmung der IL-6-Plasmaspiegel durchgeführt, um den möglichen Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung von Ebselen in diesem Tiermodell zu untersuchen. Frühe orale Ebselengabe nach fokaler cerebraler photothromboseinduzierter Ischämie hat den Anstieg von IL-6-Plasmaspiegel zum Zeitpunkt 24 h im Vergleich zu Kontrollgruppe signifikant vermindert.

IL-6-Hochregulation kommt in Neuronen und Gliazellen als Folge der cerebralen Schädigung oder unter bestimmten Bedingungen auch in Zellkulturen (33-35) vor. Die aktuellen Studien zur IL-6 Lokalisation in definierten Zelltypen nach Ischämie oder nach toxischen Einflüssen zeigen ein heterogenes Bild: *in vivo* werden große Mengen von IL-6 in Astrozyten, Mikroglia- und Endothelzellen produziert, während es *in vitro* hauptsächlich Neuronen sind, die eine IL-6-positive Immunreaktion zeigen (34, 35). Auch in unseren Tieren wurden die meisten IL-6 immunreaktiven Zellen als

Neuronen identifiziert. Unabhängig vom Typ der IL-6-produzierenden Zellen wurde festgestellt, dass der IL-6 Spiegel im cerebrospinalen Liquor und im Plasma nach cerebraler Schädigung ansteigt (22, 23). Unsere Ergebnisse zeigten, dass die kortikale Photothrombose die Produktion und Freisetzung von IL-6 auf eine ähnliche Weise wie bei anderen Apoplexmodellen beeinflusst. Die Untersuchungen von E. Tarkowski *et al.* (40) haben gezeigt, dass die IL-6 Konzentration in der cerebrospinalen Flüssigkeit signifikant mit den Hirninfarktvolumen korreliert. Somit kann möglicherweise erklärt werden wie eine Senkung der IL-6 Freisetzung bei Hirninfarkt zu einer Verminderung des Hirninfarktvolumens führen kann. Da IL-6 eine wichtige Rolle bei der Hämoxxygenase-1-Induktion spielt (15), lassen unsere Daten den Schluss zu, dass der niedrige IL-6 Plasmaspiegel für die geringere gliale Hämoxxygenase-1 Induktion in distalen supragranulären kortikalen Schichten verantwortlich sein kann. Die Größenordnung der Veränderungen, die wir für IL-6- und Hämoxxygenase-1-Expression gesehen haben, war mit Ergebnissen an anderen Apoplexmodellen vergleichbar, bei denen eine Ebselenbehandlung zu einer 20 bis 30%-igen Verminderung der Infarktgröße geführt hat (32). Das Fehlen der Wirkung innerhalb des 0,5 mm breiten Saums um den Läsionskern, das wir in dieser Studie gesehen haben, wird möglicherweise durch die unmittelbar nach der Photothrombose fehlende Perfusion in dieser Region erklärt, was eine Ebselenanlieferung zu diesem Gebiet verhindert. Außerdem waren viele Astrozyten in den distalen Regionen, in denen eine signifikante Wirkung von Ebselen auf die Hämoxxygenase-1-Hochregulation gefunden wurde, mit cerebralen Blutgefäßen assoziiert.

Perivaskuläre Astrozyten und Endothelzellen stellen eine wichtige Komponente der Blut-Hirn-Schranke (BBB) dar, und deren Aktivierung spricht für eine Störung der BBB-Integrität. Außerdem stellt das Eindringen des systemischen Häm durch die

BBB einen bekannten Induktionsfaktor für Hämoxxygenase-1 dar (12). Unsere Daten lassen generalisierte läsionsinduzierte Störungen der BBB-Integrität im periläsionalen MCA-System, die zu perivaskulärer glialer Hämoxxygenase-1 Expression führen, vermuten.

Da die ebselenbehandelten Tiere eine deutliche Verminderung von Hämoxxygenase-1-positiven Gliazellen in distalen Regionen zeigen, vermuten wir, dass Ebselen dank seiner antioxidativen Eigenschaft die Gefäßwände schützt und die Integrität sowie die Funktion der BBB aufrecht erhält.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, daß die frühe Ebselengabe möglicherweise von klinischer Bedeutung für die Behandlung des akuten ischämischen Schlaganfalls sein kann. Der mögliche Wirkungsmechanismus schließt die Unterdrückung des IL-6-Plasmaspiegelanstiegs mit ein und führt somit zu einer Minderung der oxidativen Hirngewebeschädigung.

5. Zusammenfassung

Hämoxygenase-1, ein induzierbares Hitzeschockprotein, wird durch oxidativen Stress hochreguliert; seine Expression hängt von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-1 und IL-6 ab. In der vorliegenden Studie haben wir die Effekte von oraler postläsionaler Gabe des neuroprotektiven Antioxidans Ebselen auf den Plasmaspiegel von IL-6 und die Expression der cerebralen Hämoxygenase-1 nach photothromboseinduzierter fokaler Ischämie untersucht. Ebselen (50 mg/kg KG) wurde 30 min postläsional männlichen Wistarratten verabreicht. Die Tiere wurden in 4 Gruppen: „sham“-operierte Trägersubstanz Kontrollgruppe (n=9); „sham“-operierte ebselenbehandelte Kontrollgruppe (n=8); Trägersubstanzgruppe mit Photothrombose (n=14) und ebselenbehandelte "Verum"-Gruppe mit Photothrombose (n=17).

Ebselenbehandlung resultierte in signifikanter Minderung der IL-6-Plasmakonzentrationen (26 ± 5 pg/ml) im Vergleich zur Kontrollgruppe (48 ± 9 pg/ml) 24 h postläsional. In „sham“-operierten Ratten war IL-6 im Plasma nicht messbar. Hämoxygenase-1-positive Gliazellen sind innerhalb der topographisch festgelegten periläsionalen Hirnregionen gezählt worden. Innerhalb des 0,5 mm breiten Saums, der unmittelbar mit dem Läsionskern assoziiert war, fanden wir keinen Unterschied in der Anzahl von hämoxygenase-1-positiven Gliazellen. In den distalen Regionen der ipsilateralen periläsionalen Hirnrinde traten bei ebselenbehandelten Ratten in supragranulären kortikalen Schichten signifikant weniger ($P < 0,001$) hämoxygenase-1-positive Gliazellen als bei Kontrolltieren auf. Die „sham“-operierten Ratten zeigten überhaupt keine gliale Hämoxygenase-1-Induktion.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Ebselengabe nach Photothrombose den IL-6 Plasmaspiegel und die damit verbundene gliale Hämoxygenase-1-Induktion vermindert. Da die Hämoxygenase-1-Induktion ein Marker des oxidativen Stress und somit ein Maß der darauffolgenden Hirnverletzung darstellt, bietet sich die frühe Ebselengabe beim Schlaganfallereignis als eine mögliche therapeutische Option an.

6. Literatur

- (1) Müller, A., Cadenas, E., Graf, P., and Sies, H. (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33, 3235-3239.
- (2) Masumoto, H., Sies, H. (1996) *Chem. Res. Toxicol.* 9, 262-267.
- (3) Johshita, H., Sasaki, T., Matsui, T., Hanamura, T., Masayasu, H., Asano, T., and Takakura, K. (1990) *Acta Neurochir. Suppl.* 51, 239-241.
- (4) Parnham, M.J., Leyck, S., Graf, E., Dowling, E.J., and Blake, D.R. (1999) *Agents Actions*, 32, 4-9.
- (5) Dawson, D.A., Masayasu, H., Graham, D.I., and Macrae, I.M. (1995) *Neurosci. Lett.* 185, 65-69.
- (6) Schewe, T. (1995) *Gen. Pharmacol.* 26, 1153-1169.
- (7) Sies, H. (1993) *Free Radic. Biol. Med.* 14, 313-323.
- (8) Sies, H., Masumoto, H. (1997) *Adv. Pharmacol.* 38, 229-246.
- (9) Parnham, M.J. & Sies, H. (2000) *Exp. Opin. Invest. Drugs* 9, 607-619.
- (10) Koistinaho, J., Miettinen, S., Keinanen, R., Vartiainen, N., Roivainen, R., and Laitinen, J.T. (1996) *Eur. J. Neurosci.* 8, 2265-2272.

- (11) Maines, M.D. (1997) *Annu.Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 517-554.
- (12) Turner, C. P., M. Bergeron, P. Matz, A. Zegna, L. J Noble, S. S. Panter, and F. R. Sharp (1998) *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 18, 257-273.
- (13) Tyrrell, R. (1999) *Free Radic. Res.* 31, 335-340.
- (14) Matz, P., Turner, C., Weinstein, P.R., Massa, S.M., Panter, S.S., Sharp, F.R. (1996) *Brain Res.* 713 211-222.
- (15) Deramaudt, T.B., da Silva, J.L., Remy, P., Kappas, A., and Abraham, N.G. (1999) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 185-193.
- (16) Schmidt, J., K. Mertz, and J. I. Morgan. (1999) *Mol. Brain Res.* 73, 50-59.
- (17) Panahian, N., Huang, T.J., Maines, M.D. (1999) *Brain Res.* 850, 1-13.
- (18) Dore, S., Takahashi, M., Ferris, C.D., Hester, D., Guastella D. and Snyder, S.H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 2445-2450.
- (19) Takizawa, S., Hirabayashi, H., Matsushima, K., Tokuoka, K., Shinohara, Y. (1998) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 559-569.
- (20) Panahian, N., M. Yoshiura, and M. D. Maines. (1999) *J. Neurochem.* 72, 1187-1203.

- (21) Terry, C.M., Clikeman, J.A., Hoidal, J.R., and Callahan, K.S. (1998) Am. J. Physiol. 274, H883-891.
- (22) Fassbender, K., Rossol, S., Kammer, T., Daffertshofer, M., Wirth, S., Dollman, M., Hennerici, M. (1994) J. Neurol. Sci. 122, 135-139.
- (23) McKeating, E.G., Andrews, P.J., Signorini, D.F., Mascia, L.(1997) Br. J. Anaesth. 78, 520-523.
- (24) Watson, B.D., Dietrich, W.D., Busto, R., Wachtel, M.S., and Ginsberg, M.D. (1985) Ann. Neurol. 17, 497-504.
- (25) De Ryck, M., Verhoye, M., Van der Linden, A.M. (2000) Neuropharmacology 39, 691-702.
- (26) Johanson, C.E., Palm, D.E., Primiano, M.J., McMillan, P.N., Chan, P., Knuckey, N.W., Stopa, E.G. (2000) Cell. Molec. Neurobiol. 20, 197-216.
- (27) Bidmon, H.-J., Wu, J., Buchkremer-Ratzmann, I., Mayer, B., Witte, O.W. and Zilles, K. (1998) Neuroscience 82, 377-395.
- (28) Bidmon, H.-J., Jancsik, V., Schleicher, A., Hagemann, G., Witte, O.W., Woodhams, P. and Zilles, K. (1998) Neuroscience 82, 397-420.
- (29) Bidmon, H.-J., Emde, B., Oermann, E., Witte, O.W, Görcs, T.J., Zilles, K. (2000) Pharmacopsychiatry, 33, 13-14.

- (30) Schiene, K., Bruehl, C., Zilles, K., Qu, M., Hagemann, G., Kraemer, M., and Witte, O.W. (1996) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16, 906-914.
- (31) Yamaguchi, T., Sano, K., Takakura, K., Saito, I., Shinohara, Y., Asano, T., and Yasuhara, H. (1998) *Stroke* 29, 12-17.
- (32) Takasago, T., Peters, E.E., Graham, D.I., Masayasu, H., and Macrae, I.M. (1997) *Br. J. Pharmacol.* 122, 1251-1256.
- (33) Van-Wagoner, N.J., Oh, J.W., Repovic, P., Benveniste, E.N. (1999) *J. Neurosci.* 19, 5236-5244.
- (34) Suzuki, S., Tanaka, K., Nagata, E., Ito, D., Dembo, T., Fukuuchi, Y. (1999) *Neurosci. Lett.* 62, 117-120.
- (35) Suzuki, S., Tanaka, K., Nogawa, S., Nagata, E., Ito, D., Dembo, T., Fukuuchi, Y. (1999) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 1256-1262.
- (36) Piasecki, E., Inglot, AD., Zielinska-Jencylik, J., Mlochowski, J., Syper, L. (1992) *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 40, 229-234.
- (37) Cembrzynska-Nowak, M., Inglot, AD. (1992) *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 40, 235-240.
- (38) Wendel, A., Kuesters, S., Tiegs, G. (1997) *Biomed. Environ. Sci.* 10, 253-259.

(39) Tiegs, G., Kusters, S., Kunstle, G., Hentze, H., Kiemer, AK., Wendel, A. (1998) J Pharmacol. Exp. Ther. 287, 1098-1104.

(40) Tarkowski, E., Rosengren, L., Blomstrand, C., Wikkeslö, C., Jensen, C., Ekholm, S., Tarkowski, A. (1995) Stroke 26, 1394-1398.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. D. h.c. H. Sies möchte ich für die Überlassung des Themas und die mir jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. rer. nat. H.-J. Bidmon und Herrn Dr. med. A. Schleicher, die mich jederzeit unterstützten.

Für viele praktische Hinweise und die Korrektur meiner Sprach – und Schreibfehler danke ich Herrn Peter „Peet“ Schröder.

Für die hervorragende technische Assistenz danke ich Frau Barbara Emde und Frau Annette Reimann.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Institutsangehörigen für die reibungslose Zusammenarbeit und freundliche Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sergej Gladilin
Geburtsdatum, - ort: 09.09.1965 in Moskau
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch
Schulbildung: 1972 – 1982 Moskau
Studium: 1982-1989 Hochschulstudium an der medizinischen Fakultät der Universität in Moskau
Abschluss: 1989 Diplom mit Auszeichnung als Arzt
Deutsch: 1991-1992 Deutschintensivsprachkurs im IEB, Düsseldorf
Berufstätigkeit: 09/1989-05/1991 Stationsarzt, Abteilung für Intensivmedizin (CA Herr Dr. med. habil. S. Zhourebow) und Intensive Kardiologie (CA Herr. Prof. Dr. med. Kerzman), Institut für Herz- und Gefäßchirurgie, Moskau
07/1992 – 12/1994 Assistenzarzt, Anästhesie (CÄ Fr. Dr. A. Genton). Augusta-Krankenhaus, Düsseldorf
01/1995 – 05/1999 Assistenzarzt, Praxis Dr. Wurms (praktischer Arzt), Düsseldorf
06/1999 – 11/1999 Assistenzarzt, Praxis Dr. Rethfeld (Allgemeinärztin), Düsseldorf
Seit 01/1999 Doktorand am Institut für physiologische Chemie I (Doktorvater: Prof. Dr. Dr.h.c. H. Sies), Uni Düsseldorf
Seit 03/2000 Assistenzarzt, Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin (CA Prof. Dr.med. G. Pfeifer), Krankenhaus Gerresheim, Düsseldorf
Sonographie, „Arzt im Rettungsdienst“

Sonstige

Fachkenntnisse:

Sonstiges: Russisch, Englisch,
EDV-Kenntnisse (MS-Office), FS Kl. III

Ebselen senkt den Plasmaspiegel von IL-6 (Interleukin-6) und die gliale Expression der HO-1 (Hämoxygenase-1) nach einer fokalen photothrombotischen Hirnischämie vorgelegt von Sergej Gladilin

Abstract

Hämoxygenase-1, ein induzierbares Hitzeschockprotein, wird durch oxidativen Stress hochreguliert; seine Expression hängt von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-1 (Interleukin-1) und IL-6 ab. In der vorliegenden Studie haben wir die Effekte von oraler postläsionaler Gabe des neuroprotektiven Antioxidans Ebselen auf den Plasmaspiegel von IL-6 und die Expression der cerebralen HO-1 nach photothromboseinduzierter fokaler Ischämie untersucht. Ebselen (50 mg/kg Körpergewicht) wurde 30 min postläsional männlichen Wistarratten verabreicht. Die Tiere wurden in 4 Gruppen: „sham“-operierte Trägersubstanz Kontrollgruppe (n=9); „sham“-operierte ebselenbehandelte Kontrollgruppe (n=8); Trägersubstanzgruppe mit Photothrombose (n=14) und ebselenbehandelte „Verum“- Gruppe mit Photothrombose (n=17). Ebselenbehandlung resultierte in signifikanter Minderung der IL-6-Plasmakonzentrationen (26 ± 5 pg/ml) im Vergleich zur Kontrollgruppe (48 ± 9 pg/ml) 24 h postläsional. In „sham“- operierten Ratten war IL-6 im Plasma nicht messbar. HO-1-positive Gliazellen sind innerhalb der topographisch festgelegten periläsionalen Hirnregionen gezählt worden. Innerhalb des 0,5 mm breiten Saums, der unmittelbar mit dem Läsionskern assoziiert war, fanden wir keinen Unterschied in der Anzahl von HO-1-positiven Gliazellen. In den distalen Regionen der ipsilateralen periläsionalen Hirnrinde traten bei ebselenbehandelten Ratten in supragranulären kortikalen Schichten signifikant weniger ($P < 0,001$) HO-1-positiv Gliazellen als bei Kontrolltieren auf. Die „sham“-operierten Ratten zeigten überhaupt keine gliale HO-1-Induktion. Die Ergebnisse zeigen, dass die Ebselengabe nach Photothrombose den IL-6 Plasmaspiegel und die damit verbundene gliale HO-1-Induktion vermindert. Da die HO-1-Induktion ein Marker des oxidativen Stress und somit ein Maß der darauffolgenden Hirnverletzung darstellt, bietet sich die frühe Ebselengabe beim Schlaganfallereignis als eine mögliche therapeutische Option an.



(Professor Dr. med. Dr. h. c. Helmut Sies)