UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Kopf- und Neurozentrum
Klinik und Poliklinik für Neurologie

Direktor: Prof. Dr. Christian Gerloff

Eine präklinische, randomisierte und kontrollierte multizentrische Studie zur Wirksamkeit eines neutralisierenden IL-17A Antikörpers im Schlaganfallmodell der Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Simon Koch
aus Hildesheim

Hamburg 2022

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
19.01.2023

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prof. Dr. Immo Prinz

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
PD Dr. Mathias Gelderblom

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung 5

2 Einleitung 6

2.1 Der ischämische Schlaganfall 6
2.1.1 Einteilung und Ätiologie 6
2.1.2 Aktuelle Therapiemöglichkeiten 7
2.1.3 Gesellschaftliche Bedeutung des Schlaganfalls 9

2.2 Die neuronale Zellschädigung im ischämischen Schlaganfall 10
2.2.1 Die Pathophysiologie der zerebralen Hypoxie auf zellulärer Ebene 10
2.2.2 Die ischämische Penumbra 12

2.3 Das Immunsystem im zentralen Nervensystem 15
2.3.1 Die Funktion des Immunsystems im gesunden Gehirn 15
2.3.2 Das Immunsystem im ischämischen Schlaganfall 16
2.3.3 Pro-Inflammatorische Botenstoffe 21

2.4 Die Rolle von Interleukin-17A im ischämischen Schlaganfall 24
2.4.1 Interleukin-17A wirkt pro-inflammatorisch 24
2.4.2 Gamma Delta T Zellen und Interleukin-17A im Schlaganfall 26

2.5 Die Fallstricke der Translationalen Medizin 29
2.5.1 Humane Studien zu Inflammation und Schlaganfall 29
2.5.2 Transition präklinischer Daten in die Klinik 31

3 Methoden 33

3.1 Mauslinien und Tierhaltung 33

3.2 tMCAO 33

3.3 Antikörper 35

3.4 Scoring und Verhaltenstests 36

3.5 Tierschutz 36

3.6 Magnetresonanztomographie 37

3.7 Auswertung der MRT Daten 38

3.8 Einbettung und Schneiden der Gehirne 38

3.9 Neutrophilenfärbung 39

3.10 Scannen und Zählen der Zellen 40

3.11 Statistik 40

3.12 Liste der verwendeten Gerätschaften und Programme 42

3.13 Liste der Verbrauchsmaterialien 43

4 Ergebnisse 44

4.1 Studiendesign 44

4.2 Studienverlauf und deskriptive Daten 46

4.3 Primäre Outcome Variable 47

4.4 Sekundäre Outcome Variablen 53

4.5 Infiltration Neutrophiler Granulozyten 56

4.6 Zusammenfassung der erhobenen Daten 59

5 Diskussion 61

5.1 Die Inhibition von IL-17A wirkt protektiv im Mausmodell des Schlaganfalls 61

5.2 Die Wahl des korrekten Studiendesigns 65

5.3 Die korrekte Interpretation der Studiendaten zur bestmöglichen Stichproben-selektion 67

6 Zusammenfassung 71

7 Summary 72

8 Abkürzungsverzeichnis 73

9 Literaturzitate 75

10 Danksagung 94

11 Lebenslauf 95

12 Eidesstattliche Versicherung 96

13 Anhang 97

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Der ischämische Schlaganfall führt neben seiner direkten Schädigung der Neurone und Gliazellen zu einer starken inflammatorischen Reaktion mit Beteiligung des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Diese Inflammation führt zu einer wesentlichen sekundären Schädigung der Neurone (Iadecola und Anrather 2011).
Die aktuelle Behandlung des ischämischen Schlaganfalls besteht aus der intravenösen Lyse und der mechanischen Wiedereröffnung des zerebralen Gefäßverschlusses. Eines der Hauptprobleme der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten im ischämischen Schlaganfall liegt in der fehlenden Transition präklinischer Ergebnisse in den klinischen Alltag (Dirnagl et al. 2013). Humane Studien zur Immunsuppression im Schlaganfall verblieben bisher ohne Erfolg, obwohl vielversprechende präklinische Studien vorlagen (Schmidt-Pogoda 2020). Eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problems besteht in der Durchführung präklinischer Multicenterstudien, die nach gleichen methodischen Prinzipien geplant und durchgeführt werden, wie sie für humane Studien gelten (Boltze et al. 2014). Bisher existiert nur eine derartige publizierte Studie, in der die Wirksamkeit von Natalizumab im Mausmodell des Schlaganfalls untersucht wurde (Llovera et al. 2015). Ein potentielles therapeutisches Ziel im ischämischen Schlaganfall ist das pro-inflammatorische Zytokin IL-17A. IL-17A ist ein hochkonserviertes Zytokin, von dem bekannt ist, dass es bereits früh in der entzündlichen Kaskade zu einer Potenzierung der Immunantwort führt und damit maßgeblich für die Infiltration von schädigenden Neutrophilen Granulozyten in das Schlaganfallgebiet verantwortlich ist (Veldhoen 2017). Aus monozentrischen Untersuchungen ist bekannt, dass die Neutralisierung von IL-17A zu signifikant kleineren Infarkten führt. (Gelderblom et al. 2012, Shichita et al. 2009).
Wir haben auf Basis dieser Daten eine präklinische, randomisierte, Placebo-kontrollierte Multicenterstudie zur Wirksamkeit von anti-IL-17A Antikörpern durchgeführt. Das Ziel war der Effektivitätsnachweis in der Reduktion der Schlaganfallgrößen und der funktionellen Verbesserung der Tiere durch einen IL-17A Antikörper in einem Ischämie Reperfusionsmodell des Schlaganfalls. Durch die Studie erhoffen wir einen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten im Schlaganfall zu leisten und dabei den aktuell bestehenden methodischen Einschränkungen präklinischer tierexperimenteller Studien zu begegnen.

2 Einleitung

2.1 Der ischämische Schlaganfall

2.1.1 Einteilung und Ätiologie

Schlaganfälle lassen sich in hämorrhagische und ischämische Ereignisse einteilen. Ischämien überwiegen in der Häufigkeit ihres Auftretens deutlich und machen 80-85 % aller Schlaganfälle aus (Hennerici und Kern 2017). Ischämien können anhand ihrer Ätiologie weiter unterteilt werden. Es wird zwischen Verschlüssen großer Arterien wie der Arteria carotis interna, die Arteria cerebri anterior, -media und -posterior und der Arteria basilaris und mikroangiopathischen Pathologien kleiner Gefäße unterschieden. Die Verschlüsse der großen basalen Hirnarterien entstehen u.a. durch arterio-arterielle und kardiale Embolien oder lokale atherosklerotische Prozesse. Eine detaillierte Abklärung der jeweiligen Ursache im Einzelfall ist zur Einleitung einer adäquaten Sekundärprophylaxe von entscheidender Bedeutung.

Arterio-arterielle Embolien bestehen oft aus Bestandteilen arteriosklerotischer Plaques und entstehen u.a. bei Plaquerupturen. Zusätzlich kann es bei Plaquerupturen zu lokal-thrombotischen Prozessen kommen, die lokale Gefäßverschlüsse verursachen können (Panel et al. 1997). Kardiale Embolien treten zumeist bei Vorhofflimmern auf, das im Alter gehäuft vorkommt (Staerk et al. 2017). Die durch das Vorhofflimmern bedingte Stase des Blutes im linken Vorhof führt zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems mit anschließender Thrombusbildung und Embolisierung. Gleichwohl können kardiale Embolien auch durch Klappenpathologien oder in Form paradoxer Embolien bei persistierendem Foramen ovale entstehen (Panel et al. 1997). Vereinzelt führen Vaskulitiden, autoimmune Entzündungen der Gefäße, zu Gefäßverschlüssen zerebraler Arterien. Dies betrifft in der Regel kleine Endarterien. Autoimmune Entzündungen können sich entweder im Rahmen einer generalisierten Vaskulitis im Bereich des zerebrovaskulären Systems oder ausschließlich lokal im Bereich des ZNS manifestieren (Salvarani et al. 2012). Im Rahmen von Vaskulitiden kommt es zu Stenosen und Verschlüssen im Verlauf der hirnversorgenden Arterien, so dass eine ausreichende Blutzufuhr der hiervon abhängigen Hirnareale nicht mehr gewährleistet ist (Bladin und Chambers 1994). Mikroangiopathische Infarkte sind vorrangig an den

lentikulostriatären Arterien im Bereich der Capsula Interna und im Bereich radiärer Gefäße zu finden, die das Marklager der Hemisphären versorgen. Hierbei können u.a. ein arterieller Hypertonus und eine Hypercholesterinämie zu chronischen, lokalen Veränderungen der Gefäßwände mit Verdickung der Basalmembran und hyalinen Ablagerungen führen, die dann Gefäßverschlüsse mit kleinsten ischämischen Infarkten zur Folge haben. Größere mikroangiopathische Läsionen werden als Lakunen bezeichnet (Lee 2020).

Hämorrhagische Ereignisse sind ebenso nach ihrer Lokalisation und der ihr zu Grunde liegenden Ätiologie zu unterscheiden. Intrazerebral ist die lokale Blutung des Thalamus, der Basalganglien und des Hirnstamms in sogenannter „loco typico“ am häufigsten. Blutungen sind oft ätiologisch auf eine fortgeschrittene Mikroangiopathie bei arteriellem Hypertonus zurück zu führen (Garcia und Ho 1992). Weitere Ursachen für intrazerebrale Blutungen können Gefäßmalformationen, Amyloid Angiopathien und Gefäßwandaneurysmen sein (Mehndiratta et al. 2012, Tokuda et al. 1995). Eine genaue Diagnostik ist für die Bestimmung der Blutungsursache von entscheidender Bedeutung, da sich deutliche Unterschiede in der Therapie ergeben (Hemphill et al. 2015).

2.1.2 Aktuelle Therapiemöglichkeiten

Grundsätzlich ist in der Therapie des Schlaganfalls zwischen akuter Behandlung, Primär- und Sekundärprophylaxe zu unterscheiden. Die Akuttherapie umfasst neben der medikamentösen und mechanischen Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes die stationäre Stabilisierung der Patienten auf einer Stroke Unit und die anschließende Rehabilitation. Die Primärprophylaxe zielt darauf ab, das unerwünschte Ereignis zu verhindern. Die Sekundärprophylaxe soll die Wahrscheinlichkeit senken das unerwünschte Erstereignis erneut auftreten zu lassen (Ringleb et al. 2021).

Bis vor wenigen Jahren bestand die einzige Option eine rasche Rekanalisation zu erzielen in der medikamentösen Auflösung des thrombotischen Materials durch intravenöse (i.v.) Injektion von Alteplase (rt-PA, Moussady et al. 2018). Eine seltene, dabei aber potentiell gravierende Nebenwirkung der i.v. Lyse ist die Einblutung in das ischämische Areal. Die Wahrscheinlichkeit einer Einblutung steigt mit

zunehmender Dauer der Ischämie und zunehmender Größe der Läsion. Daher ist die medikamentöse Lyse nur in engen Zeitgrenzen möglich und wenn ausgeschlossen werden konnte, dass die ischämische Läsion kleiner als 1/3 des Mediaterritoriums ist (Ringleb et al. 2021). Bis vor kurzem betrug das zugelassene Zeitfenster zwischen Einsetzen der Symptomatik und Beginn der Therapie 4,5h. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die i.v. Lyse auch dann effektiv und sicher ist, wenn MRT basierte Kriterien zur Patientenselektion herangezogen werden. Besteht ein Unterschied zwischen diffusionsgewichteten- und FLAIR gewichteten Sequenzen in der Bildgebung können auch solche Patienten mittels i.v. Lyse therapiert werden, bei denen der Zeitpunkt des Eintritts der Ischämie unklar ist (Thomalla et al. 2018). Eine weitere Möglichkeit der Akuttherapie besteht in der mechanischen, kathetergestützten Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes. Die Katheter werden hierbei über die Leiste intraarteriell eingeführt und bis zum verschlossenen Gefäß vorgeführt. Der Thrombus kann sodann über ein Drahtgeflecht geborgen werden (Saver et al. 2015). Die Methode steht jedoch nur Patienten mit einem Hauptstammverschluss einer der großen hirnversorgenden Arterie zur Verfügung.

Primär- und Sekundärprophylaxe gleichen sich hinsichtlich des ischämischen Schlaganfalls im Wesentlichen. Da ein Großteil der Verschlüsse auf arteriosklerotische Veränderungen der Gefäßwände zurückgeht, ist es ein Ziel, arteriosklerotische Veränderungen zu verhindern oder deren Progress abzuschwächen.
Faktoren, die zu arteriosklerotischen Veränderungen führen, sind vielfältig. Sie sind teilweise durch den Lebensstil oder medizinische Eingriffe veränderbar. Unveränderbare Risikofaktoren jedoch sind beispielsweise Alter und Geschlecht. So ist bekannt, dass Männer bis zum 70 Lebensjahr ein erhöhtes Risiko für arteriosklerotische Veränderungen haben. Über dem 70 Lebensjahr verschiebt sich die Risikoverteilung jedoch zu Ungunsten des weiblichen Geschlechts (Man et al. 2020). Zu den veränderbaren Risikofaktoren gehören der inhalative Konsum von Tabak, der arterielle Hypertonus, der Diabetes Mellitus, die Hypercholesterinämie und die viszerale Adipositas (Haverich und Boyle 2019). Eine wesentliche Beeinflussung dieser Risikofaktoren kann über medikamentöse Therapien und einer Anpassung des Lebensstils gelingen. So verbessert körperliche

Ausdauerbelastung das Cholesterin-Profil (Kraus et al. 2002), vermindert Übergewicht und verbessert die Insulintoleranz (Pinckard et al. 2019, Bird und Hawley 2016).

Gefäßveränderungen im Bereich der ACI, die so weit fortgeschritten sind, dass eine höhergradige Einengung eines arteriellen Gefäßes vorliegt, werden als ACI-Stenosen bezeichnet. Diese haben neben der distalen Blutflussverminderung ein erhöhtes Risiko für arterio-arterielle Embolien. Abhängig vom Grad der Einengung ergeben sich aus den aktuellen Leitlinien unterschiedliche Empfehlungen. Asymptomatische ACI-Stenosen sind ab einer Stenosierung von 60 Prozent nach NASCET-Kriterien behandlungsbedürftig, symptomatische ACI-Stenosen sollen bereits ab einer 50-prozentigen Einengung behandelt werden (Eckstein et al. 2020). Abhängig von der Konfiguration der Stenose, weiteren Vorerkrankungen des Patienten, dessen Alter und dem übrigen Gefäßstatus kann entweder die operative Entfernung mittels Thrombendarteriektomie (TEA) vorgenommen oder eine Katheter gestützte Angioplastie mit anschließender Stenteinlage durchgeführt werden (Müller et al. 2020).

Von hoher Relevanz in der Sekundärprävention ist der frühzeitige Beginn einer gerinnungshemmenden Medikation. Abhängig von Ätiologie und Begleiterkrankungen werden verschiedene Medikamentengruppen gewählt. Infarkte mit auf atherosklerotische oder mikroangiopathische Pathologien zurückzuführender Ätiologie werden mit Thrombozytenaggregationshemmern wie ASS oder Clopidogrel behandelt. Liegt eine kardiale Embolie vor, sind orale Antikoagulantia wie Vitamin-K Antagonisten, Faktor-Xa Inhibitoren oder Thrombin Inhibitoren das Mittel der Wahl (Endres et al. 2015).

2.1.3 Gesellschaftliche Bedeutung des Schlaganfalls

Der ischämische Schlaganfall ist weltweit an Platz zwei der Todesursachenstatistik (WHO, Global Health Estimates 2018). Patienten, die nicht an den direkten oder indirekten Komplikationen in der Frühphase des Schlaganfalls versterben, haben häufig unter schwerwiegenden dauerhaften Einschränkungen zu leiden. Der ischämische Schlaganfall führt, verglichen mit anderen Erkrankungen weltweit am dritthäufigsten zu einer chronischen Behinderung (Feigin et al. 2017). Die

Gesamtbelastung eines Individuums durch eine Erkrankung wird durch die disability-adjusted life-years (DALYs) bestimmt. In deren Berechnung fließen nicht nur die Krankheitsjahre, sondern auch die verlorenen Lebensjahre durch frühzeitigen Tod mit ein. Der Schlaganfall ist in den entwickelten Ländern für circa 8% aller DALYs verantwortlich. Er liegt an Platz zwei der Ursachenstatistik für die Gesamtbelastung einer Gesellschaft durch Erkrankungen, direkt und mit nur geringem Abstand hinter den ischämischen Herzerkrankungen (Feigin et al. 2017). Die Kosten für Akutbehandlung sowie Pflege und Betreuung derer, die einen Schlaganfall überlebt haben, wurden bereits im Jahr 2006 in Höhe eines Lebenszeitwertes von 43.129 Euro/Patient beziffert (Kolominsky-Rabas et al. 2006). Noch nicht berücksichtigt wurden hierbei Verdienstausfälle durch Erwerbsunfähigkeit und die Kosten einer möglichen unentgeltlichen Pflege durch Angehörige. In Anbetracht der sich stetig verbessernden Akuttherapie und der steigenden Lebenserwartung ist von einer weiteren Zunahme der Kosten/Patient auszugehen.

2.2 Die neuronale Zellschädigung im ischämischen Schlaganfall

2.2.1 Die Pathophysiologie der zerebralen Hypoxie auf zellulärer Ebene

Beim ischämischen Schlaganfall führt ein Gefäßverschluss zu einer Minderversorgung des Gehirns mit Sauerstoff und lebensnotwendigen Nährstoffen wie beispielsweise Glukose. Abbauprodukte aus dem Funktions- und Strukturstoffwechsel der Nervenzellen wie Laktat werden nicht mehr abtransportiert und verbleiben im Gewebe. Sowohl die verminderte Zufuhr neuer Substrate zu den Nervenzellen als auch der Verbleib von Metaboliten im Gewebe führen somit rasch nach Einsetzen der Ischämie zu einem klinisch manifesten neuronalen Funktionsverlust. Neurone im ischämischen Kern des Infarktgebiets werden aufgrund der erheblichen Unterversorgung mit Sauerstoff dauerhaft und unwiederbringlich geschädigt (Hossmann 1994). Nervenzellen, die in diesem Gebiet liegen, können auch durch revaskularisierende Therapien nicht gerettet werden. Die Stoffwechselaktivität dieser Zellen ist derart eingeschränkt, dass die Integrität der Zellmembran nicht aufrechterhalten werden kann, sodass ein Großteil der Zellen durch Onkose verstirbt (Loh et al. 2018). Onkose entsteht durch vermehrten Wassereinstrom in die Zelle. Ursächlich ist der Zusammenbruch der

Funktionsfähigkeit der Na^+/K^+-ATPasen, die Adenosintriphosphat (ATP) benötigen, um den erforderlichen transmembranösen Elektrolytgradienten von Na^+ und K^+ aufrecht zu erhalten, der für die Lebensfähigkeit einer Zelle notwendig ist. Fehlt als Folge der Hypoxie und Hypoglykämie ATP im ischämischen Schlaganfall, versagen die Ionenpumpen und das Membranpotential bricht zusammen (Loh et al. 2018). Neben der Onkose ist die Apoptose die zweite wesentliche Form des neuronalen Zelltods im ischämischen Schlaganfall (Fricker et al. 2018). Hierbei wird eine hochkonservierte Signalkaskade angestoßen, die zur gezielten Auflösung der Zelle in fragmentierte Bestandteile führt. Im Gegensatz zur Onkose kommt es durch die strukturierte Abfolge einzelner Abbauprozesse in der Apoptose zu einer deutlich geringeren inflammatorischen Umgebungsreaktion, sodass der weitere Schaden geringer gehalten wird (Bohm 2003). Nach eingetretener Ischämie kann eine pathologisch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration gemessen werden. Dieser Elektrolytverschiebung liegt eine verstärkte und verlängerte Depolarisation mit vermehrtem Ausstrom von K^+ zu Grunde. Neben dem vermehrten Ca^{2+} Einstrom aus dem extrazellulären Raum nimmt die zytosolische Ca^{2+} Konzentration durch eine Dysfunktion des endoplasmatischen Retikulums zu (Chen et al. 2008). Ca^{2+} bewirkt in erhöhter intrazellulärer Konzentration die Aktivierung proteolytischer, pro-apoptotischer Enzyme wie beispielsweise des Calmodulins (Szydlowski und Tymanski 2010). Aktives Calmodulin wiederum ist an der für die Apopotose notwendigen Translokation von Cytochrom-C aus der inneren mitochondrialen Membran in das Zytosol beteiligt (Broughton et al. 2009). Im ischämischen Schlaganfall sind apoptotische Prozesse vor allem im Randgebiet des ischämischen Kerngebiets und der Penumbra zu finden, während Onkose und Nekrose zumeist im ischämischen Kern vorherrschen (Uzdensky 2019).

Ein weiterer Faktor, der zur andauernden Schädigung von Neuronen in der Penumbra beiträgt ist Exzitotoxizität. Hierbei besteht ein massives extrazelluläres Überangebot von Glutamat, das von ischämisch geschädigten Neuronen freigesetzt wird (Lai et al. 2014). In der Folge einer Ischämie bewirken die pathologisch gesteigerten extrazellulären Glutamat Level eine Überaktivierung von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) und AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) Rezeptoren. Hieraus resultiert ein vermehrter Einstrom von Calcium in die Zelle, der wiederum apoptotische Signalwege anstößt. Neben der Aktivierung

proteolytischer Enzyme durch den vermehrten Ca^{2+} Einstrom führt Exzitotoxizität zu der Produktion freier Sauerstoffradikale. Diese entstehen u.a. durch Redoxreaktionen von Stickstoffmonoxid-Verbindungen (NO), die in der Zelle durch eine Neuronen-spezifischen-Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) produziert werden. Diese ist in Neuronen an einen membranständigen NMDA-Rezeptor gekoppelt und kann daher direkt durch das vermehrte extrazelluläre Glutamat aktiviert werden (Lai et al. 2014). Sauerstoffradikale sind wesentlich an der Schädigung von Proteinen und Fettsäuren beteiligt, wodurch die Funktionsfähigkeit und Überlebensfähigkeit der Neurone deutlich eingeschränkt wird (Auten und Davis 2009, Orellana-Urzúa et al. 2020).

Ein weiterer Faktor in der Entstehung neuronaler Funktionseinbußen sind sich langsam ausbreitende, progressive, kortikale Depolarisationen (CD), die vornehmlich vom Randbereich des ischämischen Kerns ausgehen (Kao et al. 2014). Diese kortikalen Depolarisationen, auch kortikale Depressionen genannt, führen zu einem Verlust der regulären neuronalen Funktionsfähigkeit. Verantwortlich hierfür sind lang andauernde transmembranöse Verschiebungen der Elektrolyte mit pathologischer Zunahme extrazellulärer K^{+} und intrazellulärer Ca^{2+} Konzentration. Diese anhaltende Aktivierung neuronaler und glialer Zellen verursacht nicht nur vorübergehende Funktionseinschränkungen, sondern auch den Untergang von Neuronen. So führt der Anstieg an prä-synaptischem Glutamat, das während der CD auftritt, über exzitotoxische Mechanismen zu einer Zellschädigung mit Apoptose (Aiba und Shu 2012).

2.2.2 Die ischämische Penumbra

Die Penumbra bezeichnet jenen Anteil des Schlaganfallgebiets, der den ischämischen Kern umgibt, in dem zunächst lediglich die Funktion gestört ist, und in dem es nicht zu einem unmittelbaren Zelltod kommt (Astrup et al. 1981, Hossmann 1994). Sie wird zumeist über den Mangel an Sauerstoff definiert. Die Sauerstoffversorgung im ischämischen Kern beträgt in der Regel weniger als 12 ml/100g/min, während sie im umliegenden Gewebe bei 12 - 35 ml/100g/min liegt. Im gesunden Gehirn werden Werte von 55 ml/100g/min gemessen (Heiss und Weber 2017). Im klinischen Alltag kann die Penumbra mittels bildgebender Verfahren wie der Magnetresonanz (MRT)- und Computertomographie (CT) identifiziert werden (Leigh et al. 2018). Wird die MRT zur Schlaganfallbildgebung

verwandt, so wird die Penumbra anhand des Unterschiedes zwischen den diffusionsgewichteten Sequenzen (Diffusion Weighted Imaging, DWI) und der Perfusionsverzögerung (Perfusion Weighted Imaging, PWI) definiert (Neumann-Haefelin et al. 1999). Die diffusionsgewichteten Sequenzen bilden jenen Anteil des infarzierten Gebietes ab, in dem es auf Grund des Zusammenbruchs des physiologischen Ionengradienten zu einer Verschiebung des extrazellulären Wassers in den Intrazellularraum kommt. Auf Grund des unterbundenen Strukturwechsel resultiert ein zytotoxisches Ödem. Die perfusionsgewichteten Sequenzen, für die eine intravenöse Kontrastmittelgabe notwendig ist, definieren jenen Anteil des Schlaganfallareals, der eine verminderte Blutversorgung mit konsekutiver Sauerstoffminderversorgung hat. In diesem Gebiet ist das neuronale Gewebe vital, jedoch in seiner Funktionsfähigkeit eingeschränkt (Heiss und Weber 2017). Ähnlich erfolgt die Darstellung der Penumbra mittels CT Bildgebung. Hierbei wird die Penumbra als Unterschied zwischen einem nur moderat abgesenkten cerebralen Blutfluss (CBF) und einer deutlichen Verlängerung in der Time-To-Peak (TTP) Messung in der Perfusionsbildgebung definiert. Der ischämische Kern hingegen entspricht dem Gebiet, in dem es sowohl zu einer Verlängerung der TTP als auch zu einer deutlichen Verminderung des CBF kommt (Wannamaker et al. 2019). Relevant ist die Darstellung der Penumbra, da auf der Basis des Verhältnisses zwischen Infarktkern und Penumbra über re-vaskulierende Maßnahmen entschieden wird.

Die Penumbra ist nicht nur bildmorphologisch mittels cMRT und CCT darstellbar, sie lässt sich ebenso histologisch bestimmen. So konnte gezeigt werden, dass apoptotische Vorgänge in der Penumbra auch nach der initialen zerebralen Ischämie stattfinden (Nedergaard 1987, Li et al. 1995). Diese apoptotischen Vorgänge werden über die zuvor diskutierten Mechanismen der sekundären Zellschädigung hervorgerufen. So entsteht die CD im Randbereich des Infarktkerns und breitet sich von hier wellenförmig über das umliegende neuronale Gewebe aus (Kao et al. 2014). In der Folge kommt es zu einem erhöhten lokalen Sauerstoffverbrauch und einer Schwellung der Neurone mit Verlust von Dendriten (Takano et al. 2007). Überschreitet die CD eine kritische Schwelle gehen die Neurone bei gleichzeitig vermindertem Sauerstoffangebot im Rahmen des Schlaganfalls in Apoptose (Uzdensky 2019). Mechanismen wie CD und

Exzitotoxizität sind dabei nicht als unabhängige pathologische Mechanismen der ischämischen neuronalen Schädigung zu werten. Vielmehr beeinflussen sich die pathologischen Mechanismen in der Penumbra gegenseitig. So ist die pathologisch erhöhte Konzentration extrazellulären Glutamats auch als Folge der CD zu werten. Gleichzeitig führen die erhöhten Glutamat Level mittels Exzitotoxizität zu einem Progress der sekundären Schädigung (Hinzman et al. 2015).

Ein wesentlicher Aspekt der Pathophysiologie der Penumbra liegt in einer Störung der Funktionsfähigkeit der Blut-Hirn-Schranke (Blood Brain Barrier, BBB). Diese bietet unter physiologischen Bedingungen einen effektiven Schutz des ZNS gegenüber Bakterien und Viren (Liebner et al. 2018). Strukturell ist die BBB durch einen engen Zusammenschluss verschiedener Zellpopulationen zu einer Neurovaskulären Einheit (Neurovascular unit, NVU) gekennzeichnet. In dem NVU Verbund sind Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten strukturell eng miteinander verknüpft, um eine Abschirmung des vaskulären Kompartiments vom Hirnparenchym zu gewährleisten. Tight junctions fungieren hierbei als interzelluläre Verbindungen und dienen der Regulation transzellulärer Diffusion von Eiweißen und Infiltration von Zellen in das Hirnparenchym. Verschiedene Mechanismen wie die rezeptorvermittelte Transzytose oder auch aktive Transportprozesse ermöglichen jedoch die Weiterleitung notwendiger Nährstoffe oder Proteine in das ZNS (Li et al. 2021). Auch können über spezialisierte Ankerproteine Zellen des Immunsystems in das zentrale Nervensystem einwandern (Ransohoff und Engelhardt 2012).

Im Verlauf des ischämischen Schlaganfalls kommt es zu einem Zusammenbruch der Integrität der BBB. Zum einen durch die direkte hypoxische Schädigung der Zellen der NVU und zum anderen durch Zerstörung des intakten Zellverbundes der NVU. Hierbei werden interzelluläre Tight Junctions u.a. durch Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) geschädigt, die von Immunzellen produziert werden. Als Folge des Zusammenbruchs der NVU entwickelt sich ein progredientes vasogenes Ödem im Hirnparenchym und die Infiltration aktivierter Immunzellen in das Hirnparenchym wird erleichtert. Beide Prozesse sind maßgeblich an der sekundären Schädigung beteiligt (Bernardo-Castro et al. 2020, Gauberti et al.2016).

2.3 Das Immunsystem im zentralen Nervensystem

2.3.1 Die Funktion des Immunsystems im gesunden Gehirn

Im gesunden Gehirn finden sich eine Vielzahl ortsständiger Mikroglia, die essentiell für die immunologische Überwachung sind. (Prinz et al. 2019). Weiterhin finden sich Makrophagen und T Zellen in den Meningen mit physiologischen Funktionen unter homöostatischen und pathologischen Bedingungen (Li und Barres 2018).

Mikroglia sind als Abkömmlinge des hämatopoetischen Systems Teil der Gliazellen des Gehirns. Ihre Rolle liegt in der immunologischen Überwachung des ZNS, dem Abbau apoptotischen Materials und dem fortwährenden Umbau synaptischer Verbindungen der Neurone. Die Einwanderung in das ZNS erfolgt während der embryonalen Entwicklung, hier erneuern sie sich fortwährend aus ihrem bestehenden Zellpool. Phylogenetisch sind sie dem angeborenen Immunsystem zugehörig (Prinz et al. 2019).

Makrophagen sind wie Mikroglia Teil des mononukleären phagozytierenden Systems (MPS). Sie sind im physiologischen Zustand in den Meningen, den perivaskulären Räumen und dem choroidalen Plexus lokalisiert (Li und Barres 2018). Hier üben sie wichtige Funktionen aus, u.a. in der Entsorgung extrazellulären Materials, der Interaktion mit den sie umgebenden Zellen und der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke (Herz et al. 2017; Yang et al. 2019).

Neben Makrophagen als Abkömmlinge des MPS finden sich γδ T Zellen in den Meningen des gesunden Gehirns. Hier sind sie durch Ausschüttung von Interleukin-17A unter anderem an der Funktionsfähigkeit des Kurzzeitgedächtnisses beteiligt. Fehlen die Zellen oder wird ihre Funktionsfähigkeit durch Gabe von IL-17A Antikörpern gemindert, zeigen die untersuchten Mäuse eine deutliche Beeinträchtigung im Kurzzeitgedächtnis, wobei der IL-17A Effekt indirekt über eine Produktion des Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) vermittelt wird (Ribeiro et al. 2019). Neben ihrer Rolle in der Konsolidierung von Gedächtnisinhalten beeinflusst die Funktionsfähigkeit von γδ T Zellen das Angstverhalten von Mäusen. So konnte gezeigt werden, dass von γδ T Zellen produziertes IL-17A einen wesentlichen Einfluss auf das Angst- und Explorationsverhalten der Tiere hat.

Solche Tiere mit fehlenden γδ T Zellen oder vermindertem IL-17A zeigten in den Testverfahren ein signifikant stärkeres Erkundungsverhalten als die Kontrolltiere (Alves de Lima et al. 2020). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-17A ein wesentlicher Faktor in der Entwicklung sozialen Verhaltens von Mäusen ist (Reed et al. 2020). Im Modell des Caenorhabditis elegans konnte darüber hinaus ein direkter Einfluss von IL-17 auf die Neurophysiologie von Neuronen gefunden werden (Chen et al. 2017).

Insgesamt bleibt somit festzuhalten, dass Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems im ZNS direkte Funktionen wie den Abbau und Abtransport apoptotischen Materials ausüben. Leukozyten beeinflussen darüber hinaus jedoch auch funktionelle Verhaltensweisen von Mäusen wie Angst- und Lernverhalten. Diese Beeinflussung erfolgt über die Produktion verschiedener Zytokine wie beispielsweise des IL-17A (Alves de Lima et al. 2020, Ribeiro et al. 2019, Prinz et al. 2019).

2.3.2 Das Immunsystem im ischämischen Schlaganfall

Im experimentellen Schlaganfallmodell der Maus zeigt sich nach der initialen hypoxischen neuronalen Schädigung eine rasch einsetzende Entzündungsreaktion mit zellulärer Infiltration. Hierdurch ergibt sich eine Verstärkung der neuronalen Schädigung im Randbereich der eigentlichen Ischämie (Iadecola und Anrather 2011). Es kommt zunächst zu einer massiven Einwanderung von Makrophagen und die Anzahl aktivierter Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre nimmt deutlich zu. Im Anschluss steigt die Menge infiltrierender Neutrophiler Granulozyten, T- und B-Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und dendritischer Zellen innerhalb von 72 Stunden signifikant. In diese Gruppe fallen auch γδ T Zellen und weitere angeborene Lymphozyten (Innate lymphocytes, Gelderblom et al. 2009). Die verschiedenen Zelltypen haben jeweils unterschiedliche Funktionen, stehen jedoch u.a. durch Zytokine und Chemokine in enger Interaktion und wirken dementsprechend funktionell zusammen. Die Inflammation, die im Rahmen der Hypoxie im Gehirn entsteht, ist jedoch nicht ausschließlich als negativ zu betrachten. Die infiltrierenden Immunzellen sind auch an dem Abbau apoptotischen und nekrotischen Materials und an der Reorganisation des zerstörten Gewebes beteiligt (Burda und Sofroniew 2014). Während sich pro-inflammatorische Zytokine

wie IL-1ß, TNF-α, IL-6 und IL-17A schädigend auswirken, besitzen andere Zytokine wie IL-4 und IL-10 einen protektiven Effekt in der zerebralen Ischämie (Lambertsen et al. 2019, Liu et al. 2016, Xiong et al. 2011, Garcia et al. 2017, Piepke et al. 2021)

Nach derzeitigem Kenntnisstand haben Mikroglia im ischämischen Schlaganfall pleiotrope Funktionen. Sie proliferieren innerhalb der ersten Stunden nach Ereigniseintritt. Hierdurch sind sie unter den ersten Immunzellen, die in der Folge der Ischämie aktiviert werden (Gelderblom et al. 2009). Mikroglia können verschiedene Phänotyopen annehmen, die mit pro- (M1) und auch anti-inflammatorischen Prozessen (M2) assoziiert werden. Die M1 Variante zeichnet sich durch eine Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1β, TNF-α, IFN-γ und IL-6 aus. Mikroglia mit M2 Phänotyp hingegen produzieren nach Aktivierung immunsuppressive Botenstoffe wie IL-10 und TGF-β (Qin et al. 2019). Aktiviert werden Mikroglia, ebenso wie die anderen Zellen des mononukleären phagozytierenden Systems über sogenannte Danger Associated Molecular Patterns (DAMPS), die u.a. von nekrotischen Zellen freigesetzt werden (Gülke et al. 2018). Während M1- und M2-Phänotyp teils sehr differenzierte Funktionen ausüben ist die selektive Depletion von Mikroglia in der Maus insgesamt mit einem verschlechterten Outcome verbunden (Szalay et al. 2015, Jin et al. 2017). Der M1 Phänotyp hat durch die Produktion von MMP-9 einen wesentlichen Anteil an der Auflösung der BBB und ist hierdurch an der Entstehung und Aufrechterhaltung der ischämischen Penumbra beteiligt (Svedin et al. 2007). Durch die Schädigung der BBB ist es anderen Zellen des Immunsystems wie Neutrophilen Granulozyten oder Lymphozyten einfacher möglich in das ZNS zu infiltrieren (Kang et al. 2020). Auch besitzen die M1 polarisierten Mikroglia eine erhöhte Aktivität der iNOS. Die hierdurch erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies kann zu einem verstärkten neuronalen Zelltod führen (Ono et al. 2010). Wesentlich zur Potenzierung der inflammatorischen Reaktion trägt die Produktion von IL-1β bei. Dieses Zytokin wird mittels einer hochkonservierten Signalkaskade durch M1 polarisierte Mikroglia produziert und freigesetzt (Gülke et al. 2018). Neben ihrer anti-inflammatorischen Funktion haben M2 polarisierte Mikroglia eine wesentliche Rolle in der neuronalen Regeneration nach der Ischämie. Neuere Studiendaten deuten zum einen auf eine positive Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung

neuronaler Prekusorzellen, zum anderen auf eine reduzierte gliale Narbenbildung durch M2 polarisierte Mikroglia hin (Li und Tsokos 2021, Choi et al. 2017)
Betrachtet man die Verteilung und den zeitlichen Ablauf der Polarisierung der Mikroglia fällt auf, dass zunächst der protektive M2 Phänotyp im ischämischen Areal vorherrschend ist. Im Verlauf finden sich jedoch vermehrt M1 polarisierte Zellen (Hu et al. 2012). Hier besteht gegebenenfalls eine Möglichkeit der therapeutischen Intervention. Insgesamt bedarf es jedoch weiterer intensiver Forschung, um diesen Dualismus besser zu verstehen und einen klinischen Nutzen aus diesem ziehen zu können. Dies wird auch vor dem Hintergrund neuer Daten aus Transkriptomanalysen deutlich, die mikrogliale Aktivierungsmuster über das klassische M1/M2 Muster hinaus zeigen (Deng et al. 2020).

Neben Mikroglia üben auch andere Zellen des Mononukleären Phagozytierenden Systems einen unmittelbaren Einfluss auf die postischämische Entzündungsreaktion aus. So kommt es bereits innerhalb des ersten Tages zu einer massiven Infiltration von Monozyten/Makrophagen in das ischämische Gebiet (Gelderblom et al. 2009).
Die in das Schlaganfallgebiet infiltrierenden Monozyten rekrutieren sich aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark. Nach Übertritt in das Hirnparenchym im ischämischen Schlaganfall findet eine Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen statt (Han et al. 2020). Frühe Studien kamen zu dem Ergebnis, dass eine vermehrte Infiltration von Monozyten in das Schlaganfallgebiet mit einem verschlechterten Outcome verbunden ist. CCR2, der Rezeptor für das Chemokin CCL2, wird typischerweise von infiltrierenden Monozyten exprimiert. Mäuse mit fehlendem CCR2 Rezeptor zeigten eine verminderte monozytäre Infiltration in das Schlaganfallgebiet und eine signifikante Reduktion der Infarktvolumina (Han et al. 2020, Dimitrijevic et al. 2007). Wird im zentralen Nervensystem von Mäusen jedoch vermehrt CCL2 produziert, zeigten diese Tiere im Schlaganfall neben einer verstärkten monozytären Infiltration signifikant vergrößerte Infarktvolumina (Chen et al. 2003). Neben diesen Daten, die einen negativen Effekt infiltrierender Monozyten auf die Mäuse nach zerebraler Ischämie aufzeigen, ergeben neuere Studiendaten einen gegenteiligen Effekt. So konnte durch die selektive pharmakologische Blockierung des CCR2 Rezeptors die Infiltration von Monozyten in das Schlaganfallgebiet reduziert werden. Durch die reduzierte Infiltration von Monozyten

ergab sich eine verminderte Anzahl Makrophagen im Schlaganfallgebiet. Dies führte zu einer Zunahme der Infarktgrößen und einem verschlechterten funktionellen Outcome der Tiere (Chu et al. 2015). Ebenso konnte die Notwendigkeit früh infiltrierender Monozyten für die funktionelle Wiederherstellung und die Angiogenese nach zerebraler Ischämie im Mausmodell gezeigt werden (Pedragosa et al. 2020). Gleich dem Dualismus des M1- und M2 Phänotyps der Mikroglia, können die aus Monozyten entstandenen Makrophagen einen pro- oder anti-inflammatorischen (M1/M2) Phänotyp annehmen (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). In den ersten Tagen nach Eintritt des ischämischen Ereignisses dominiert unter den infiltrierenden, von Monozyten abstammenden Makrophagen zunächst ein M2 ähnlicher, anti-inflammatorischer Phänotyp mit regenerativem Profil. Erst im Verlauf herrscht dominiert der pro-inflammatorische M1 Typ (Rajan et al. 2019).
Insgesamt ist somit festzuhalten, dass ähnlich der dualistischen und bisher nicht vollends verstandenen Funktion von Mikroglia, Makrophagen/Monozyten eine gleichartige Rolle mit ähnlichem zeitlichen Verteilungsmuster des M1/M2 Typs einnehmen und sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen erzielen. Auch hier ist jedoch weitere Forschung notwendig um diese dualistische Funktion besser zu verstehen und hierdurch Ableitungen für die klinische Tätigkeit treffen zu können.

Neutrophile Granulozyten (Polymorphonuclear leukocytes, PMNs) sind im infektiös- oder autoimmun-entzündeten Gewebe u.a. an der Phagozytose von Pathogenen, der Ausschüttung proteolytischer Enzyme, der Produktion von extrazellulären Fallen (Neutrophil extracellular traps, NETs) und der Produktion radikaler Sauerstoffspezies beteiligt und dienen somit der Abwehr von Pathogenen und der Reorganisation von apoptotischem und nekrotischem Gewebe (Amulic et al. 2012). PMNs infiltrieren kurze Zeit nach den Monozyten in das ischämische Areal im Schlaganfall (Gelderblom et al. 2009). Hier sind sie an der sekundären Schädigung maßgeblich beteiligt (Jickling et al. 2015). Im Mausmodell des Schlaganfalls sind Tiere geschützt, in denen die Infiltration Neutrophiler Granulozyten unterbunden wird, beispielsweise durch die Blockade von ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1), einem wichtigen Zelladhäsionmolekül oder dem funktionellen Verlust der MMP-9, einer wichtigen Protease, die an der Auflösung der BBB beteiligt ist (Zhang et al. 1995, Gidday et al. 2005). Im ischämischen Schlaganfall ist eine

erhöhte Anzahl an NETs nachweisbar. Nach intravenöser Lyse mittels rtPA führen diese NETs zu einer vermehrten Durchlässigkeit der BBB was mit einer erhöhten Einblutungsgefahr einhergeht und somit zu einer schweren sekundären Schädigung führen kann (Wang et al. 2021). Die Infiltration von PMNs erfolgt zumeist über die leptomeningealen Gefäße, was sowohl im Tiermodell direkt mittels In-Vivo Imaging als auch im Menschen gezeigt werden konnte (Neumann et al. 2018, Perez-de-Puig et al. 2015).

In den letzten Jahren konnten neben der schädigenden Wirkung der PMNs jedoch auch protektive Effekte dieser Zellen nachgewiesen werden. Ähnlich dem Dualismus von Mikroglia und Makrophagen mit Aufteilung in M1 und M2 Phänotyp, scheinen auch Neutrophile Granulozyten verschiedene Funktionszustände, N1 und N2, bei unterschiedlichen pathophysiologischen Zuständen anzunehmen (Wang et al. 2018). Zahlreiche Studien belegen einen protektiven Effekt N2 polarisierter PMNs im ischämischen Schlaganfall. So konnte nachgewiesen werden, dass die Gabe von Rosiglitazon, einem PPARγ (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma) Agonisten zu einer vermehrten Expression N2 typischer Antigene wie Ym1 (Chitinase-like protein, Chil3) und CD206 führt und darüber hinaus einen neuro-protektiven Effekt besitzt (Cuartero et al. 2013). Ebenso zeigten sich bei Mäusen, die keinen Toll-Like Rezeptor 4 (TLR4) besaßen, kleinere Infarkte bei gleichzeitig vermehrter Infiltration von PMNs mit mehrheitlich N2 typischem Expressionsmuster (García-Culebras et al. 2019). Sowohl in-vitro als auch in-vivo nach tMCAO konnte gezeigt werden, dass sich die Menge N2 polarisierter Neutrophiler Granulozyten positiv auf die Anzahl apoptotischer Neurone und das Outcome in Verhaltenstests der Tiere auswirkte (Hou et al. 2019).

Nach aktueller Studienlage ist von einer am ehesten neuro-toxischen Rolle der infiltrierenden Neutrophilen Granulozyten auf das post-ischämische Gehirn auszugehen (Hermann et al. 2018). Es ist jedoch weiterer Forschungsbedarf hinsichtlich des Dualismus von N1- und N2-polarisierten Neutrophilen Granulozyten und deren Funktionen im ischämischen Schlaganfall notwendig um ein differenziertes Bild über die Funktion von Neutrophilen Granulozyten in der zerebralen Ischämie zu erhalten.

Der Großteil der an der inflammatorischen Reaktion beteiligten Lymphozyten sind Bestandteile des adaptiven Immunsystems. Sie haben einen wesentlichen Anteil

am durch den Schlaganfall entstehenden Schaden und infiltrieren innerhalb der ersten Tage in das ZNS (Gelderblom et al. 2009). Für diese Infiltration werden verschiedene Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise das VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) benötigt, deren Expression im ischämischen Schlaganfall hochreguliert wird (Liesz et al. 2011, Zhang et al. 2021). Neben der Infiltration von Lymphozyten hat nach neueren Untersuchungen auch die Proliferation von $CD3^+$ Zellen innerhalb des ZNS einen gewissen Anteil an der post-ischämischen Inflammation. Diese, sich aktiv teilenden $CD3^+$ T-Zellen finden sich gruppiert in Nestern auch noch mehrere Wochen nach dem Schlaganfall. Ihre genauere Funktion ist derzeit jedoch noch nicht vollends verstanden (Heindl et al. 2021, Xie et al. 2019). Es sind solche Tiere im murinen Schlaganfallmodell geschützt, die keine funktionsfähigen $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen besitzen (Hum et al. 2007, Yilmaz et al. 2006). Die medikamentöse Blockade der Rekrutierung peripherer Lymphozyten durch FTY-720, einem Sphingosin-1-Phosphat (S1P) Rezeptor Modulator, bekannt aus der Multiplen Sklerose, führt zu einer Minimierung der Infarktgrößen und einem verbesserten Langzeitüberleben im murinen Schlaganfallmodell (Wei et al. 2011). Negative Folgen durch Lymphozyten können sowohl direkt als auch indirekt vermittelt werden. Direkt zellschädigend wirken zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen mittels Perforin und Granzym-B. Dieser Mechanismus wurde sowohl im Tiermodell, als auch in post-mortem Analysen aus humanem Material detektiert (Chaitanya et al. 2010, Pan et al. 2021). $CD4^+$ Lymphozyten hingegen produzieren im Schlaganfall vermehrt IL-21, was zu vergrößerten Schlaganfällen im Mausmodell führt (Clarkson et al. 2014). Von $CD4^+$ T-Zellen produziertes IFN- γ ist u.a. an der Induktion der TNF-α Produktion durch Makrophagen beteiligt (Gelderblom et al. 2012).
Neben den $CD4^+$ und CD8+ positiven T-Zellen haben γδ T Zellen einen relevanten Einfluss auf die post-ischämische Entzündungsreaktion (Gelderblom et al. 2012), wie im Folgenden näher diskutiert.

2.3.3 Pro-Inflammatorische Botenstoffe

Die Aktivierung und Interaktion der an der Inflammation beteiligten Zellen geschieht größtenteils über Zytokine und Interleukine. Diese werden sowohl von Leukozyten selbst, als auch von ortsständigen Zellen des ZNS gebildet. Diesen Botenstoffen kommt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten zu,

da sie einen gut zugänglichen Angriffspunkt für Medikamente bieten (Lambertson et al. 2019). Zytokine und Interleukine wie der Tumor-Nekrose Faktor Alpha (TNF-α) wirken jedoch nicht nur lokal im ZNS, sondern besitzen im gesamten Körper wichtige physiologische Funktionen, die über die pathologische Rolle bei Autoimmunkrankheiten oder einer überschießenden Immunantwort hinaus gehen. Es ist daher in jedem Fall zu beachten, dass ein Eingriff in dieses System unerwünschte Nebeneffekte haben kann (Scheinfeld 2004). Exemplarisch wird im Folgenden auf zwei Zytokine eingegangen, die auch in der Signalkaskade der IL-17A von hoher Relevanz sind, dem TNF-α und dem Interleukin-1ß (IL-1β).

Bereits früh nach der Ischämie kommt es zu einer Zunahme TNF-α positiver Mikroglia und Makrophagen im Schlaganfallgebiet (Buttini et al. 1996). Die Rolle, die TNF-α hierbei im Schlaganfall einnimmt, ist bisher jedoch nicht vollends verstanden (Lambertsen et al. 2019). So führte in transgenen Mäusen das vollständige Fehlen von TNF-α im Schlaganfall zu einer signifikanten Zunahme der Infarktgrößen im Vergleich zu Kontrolltieren (Lambertsen et al. 2009). Die medikamentöse Blockade von TNF-α durch dessen Inhibitor Etanercept hatte in einer weiteren Untersuchung jedoch keinen Effekt auf die Infarktgrößen im Tiermodell des Schlaganfalls. Gleichwohl zeigte sich in dieser Studie nach der Behandlung mittels Etanercept ein signifikant gebesserter Funktionszustand, gemessen anhand der motorischen Fähigkeiten der Tiere (Clausen et al. 2014). Diese motorischen Fähigkeiten zeigten sich ebenfalls nach einer medikamentösen Behandlung durch XPro1595, einem Inhibitor der löslichen Form von TNF-α, gebessert (Clausen et al. 2014, Lambertsen et al. 2019). Insgesamt erscheint die Rolle von TNF-α daher noch nicht vollends verstanden und bedarf weiterer Forschung.

Im Menschen wurden bisher keine Therapien mit TNF-α Inhibitoren im akuten Stadium des Schlaganfalls innerhalb der ersten Stunden bis Tage nach Symptomeintritt durchgeführt. Es existieren jedoch zwei nicht kontrollierte Studien an Patienten mit bereits Monate bis Jahre zurückliegenden ischämischen Schlaganfällen. In einer Fallstudie an drei Patienten mit 13-36 Monate zurückliegenden Infarkten ergab sich nach paraspinaler Etanercept-Injektion eine innerhalb weniger Minuten einsetzende globale Verbesserung der neurologischen Defizite. Es wurde beschrieben, dass sich sowohl Sprache, kognitive Fähigkeiten,

Gangmotorik als auch Feinmotorik in der klinischen Beobachtung rasch besserten. Standardisierte Testverfahren wurden jedoch nicht genutzt. Ein Vergleich gegen ein Placebo fand nicht statt (Tobinick 2011). Eine nicht kontrollierte, open-label Beobachtungsstudie an 629 Patienten mit Monate bis Jahre zurückliegenden Schlaganfällen ergab eine signifikante klinische Besserung in den Vorher-Nachher Analysen hinsichtlich der Zeit in der 20m Gehstrecke, der Handkraft, der kognitiven Leistungsfähigkeit im MOCA (Montreal Cognitive Assessment) sowie unterschiedlichen, nicht näher definierten neurologischen Testverfahren hinsichtlich Kognition, Sprache, Spastizität und Sensibilität. Eine Placebo Kontrollgruppe existierte nicht (Tobinick et al. 2012).
Vor einem weiteren Einsatz im Menschen sind in Anbetracht der methodischen Mängel der bisherigen Studien und der unterschiedlichen Wirksamkeit der TNF-α Behandlung im Tiermodell zunächst weitere Untersuchungen hinsichtlich der Sicherheit und Effektivität der TNF-α Blockade im Tier notwendig.

IL-1β ist ein pro-inflammatorischer Botenstoff, der bereits früh nach der Ischämie im Schlaganfallgebiet exprimiert wird (Davies et al. 1999). Neben Zellen des MPS sind auch Astrozyten und Neurone an dessen Produktion beteiligt (Davies et al. 1999; Johann et al. 2015, Franke et al. 2020). Nach Aktivierung der Zellen wird zunächst vermehrt die Pro-Form des IL-1βs produziert, welche Caspase abhängig durch post-translationale Protein Modifikation in die aktive Form überführt wird (Miao et al. 2011). Die Freisetzung des funktionsfähigen IL-1β geschieht sowohl zelltodabhängig (Pyroptose) oder -unabhängig. Pyroptose führt zu einem starken intrazellulären Wassereinstrom mit konsekutiver Zelllyse und Freisetzung des IL-1βs. Zelltodunabhängig erfolgt die Ausschüttung über durch Gasdermin-D gebildete Poren in der Zellmembran (Evavold et al. 2018).
Im experimentellen Modell des Schlaganfalls konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Produktion von IL-1β schädigende Folgen hat. Tiere, die entweder kein IL-1 α/β oder keine funktionsfähige Caspase-1 besaßen, hatten kleinere Infarkte verglichen mit Wildtyp-Mäusen (Boutin et al. 2001, Hara et al. 1997). Sowohl die zentrale als auch periphere Injektion eines IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1Ra) führte in Wildtyp-Tieren zur signifikanten Reduktion der Infarktgrößen (Touzani et al. 2002, Garcia et al. 1995).

In zwei klinischen randomisierten und kontrollierten Phase II Studien wurde ein IL-1Ra im Schlaganfall getestet. Emsley et al. (2005) konnten zeigen, dass die i.v. Infusion von Anakinra, einem IL-1R Antagonisten, mit einer höheren, jedoch nicht signifikanten Wahrscheinlichkeit eines niedrigen mRS Score und verminderten peripheren Entzündungszeichen einherging. Die s.c. Injektion führte in einer weiteren Studie zu signifikant niedrigeren IL-6 Leveln. Ein Effekt auf den mRS Score konnte jedoch nicht gefunden werden (Smith et al. 2004, Smith et al. 2018). Eine Phase II Studie hinsichtlich der Wirksamkeit und Sicherheit der s.c. Injektion von Anakinra an Patienten mit aneurysmatischer Subarachnoidalblutung konnte gleichsam eine signifikant verminderte periphere Immunreaktion ohne eindeutigen Nachweis einer signifikanten Verbesserung in der Glascow Coma Scale (GCS) erbringen (Galea et al. 2018).

2.4 Die Rolle von Interleukin-17A im ischämischen Schlaganfall

2.4.1 Interleukin-17A wirkt pro-inflammatorisch

Interleukin-17 (IL-17) ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das einen wesentlichen Einfluss auf das Immunsystem und dessen Aktivierung in Entzündungsprozessen besitzt. Es fungiert hierbei pleiotrop mit vielfältigen Funktionen, und kann eine Intensivierung der Inflammation bewirken (Veldhoen 2017).
Von IL-17 existieren verschiedene Unterformen, wobei die in Entzündungsprozessen hauptsächlich relevanten, bisher bekannten Isoformen IL-17A und IL-17F sind. Diese Zytokine fungieren entweder jeweils als Homodimer oder gemeinsam als Heterodimer und binden an IL-17 Rezeptoren (IL-17R, Goepfert et al. 2017). Die IL-17R bestehen aus einer Gruppe heterodimerer, transmembranöser Proteine, die im Wesentlichen von IL-17RA und IL-17RC gebildet werden (McGeachy et al. 2019). Nach extrazellulärer Bindung von IL-17A an den heterodimeren IL-17A/C Rezeptor erfolgt eine intrazellulare Signaltransduktion. Ziel dieser Signalkaskade ist die verstärkte Transkription von Zielgenen von IL-17A und die post-transkriptionelle Regulation der mRNA dieser Proteine. Die intrazelluläre Signalkaskaden erfolgt über eine Aktivierung von ACT1 und die daraus resultierende Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) in den Nukleus zur Transkription der Zielgene von IL-17A (Li et al. 2019). Relevante Zielproteine des

IL-17A Signalwegs nach Bindung an den IL-17 Rezeptor sind u.a. die bereits diskutierten, pro-inflammatorischen Botenstoffe IL-6, IL-1β und TNF-α, wodurch eine relevante Amplifikation der post-ischämischen Inflammation entsteht (Veldhoen 2017). Die Effekte von IL-17A werden im Wesentlichen indirekt vermittelt. So wird beispielsweise bei begleitender Ko-Stimulation mit TNF-α vermehrt das Chemokin CXCL-1 in Zellen des Bindegewebes und des Endothels produziert. Hierauf folgt eine vermehrte Infiltration Neutrophiler Granulozyten, die den passenden CXCR-2 Rezeptor zum CXCL-1 Liganden tragen (Gelderblom et al. 2012, Griffin et al. 2012).

Die Hauptproduzenten von IL-17A sind Th-17 und γδ T Zellen. Th-17 Zellen sind als Teil der adaptiven Abwehr eine eigenständige Gruppe von $CD4^+$ T-Helferzellen. Die Differenzierung aus naiven $CD4^+$ zu Th-17 Zellen wird durch verschiedene Zytokine und Interleukine vermittelt (Veldhoen et al. 2006). Hierfür bedarf es entweder der Stimulation naiver T-Zellen mit IL-6 und TGF-β, IL-21 und TGF-β oder IL-6, IL-1β und IL-23 (Korn et al. 2009, Ghoreschi et al. 2010, Veldhoen et al. 2006). γδ T Zellen nehmen als IL-17A Produzenten im Gegensatz zu TH-17 Zellen eine intermediäre Rolle zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem ein, sind funktionell jedoch dem angeborenen Immunsystems zuzuordnen. Sie besitzen statt den T-Zell typischen αβ -Rezeptoren eine eigene Unterform von T-Zell Rezeptoren, bestehend aus γ- und δ-Ketten (Morita et al. 2000). Im Gegensatz zu $CD4^{+/}CD8^+$ Zellen können sie unabhängig des T-Zell Rezeptors, beispielsweise durch andere Zytokine und Interleukine aktiviert werden (Tanaka et al. 1995, Ribeiro et al. 2015). So kann die IL-17A Produktion allein durch Stimulation mit IL-1β und IL-23 induziert werden (Sutton et al. 2009). Durch diese, Antigen unabhängige Aktivierung von γδ T Zellen ist IL-17A wesentlich an der Amplifikation der inflammatorischen Reaktion beteiligt. Die Dynamik der IL-17A Reaktion bewirkt daher eine frühzeitige, verstärkte Entzündungsreaktion. Hierdurch kann schnell, auch unabhängig des adaptiven Immunsystems auf schädigende Reize reagiert werden (Papotto et al. 2017).
γδ T Zellen sind zumeist im Bereich der epithelialen Barrieren des Körpers wie beispielsweise dem Darm, der Haut und der oralen Mukosa zu finden. Ihre Aufgabe besteht neben der schnellen Reaktion auf pathogene Reize in der Interaktion mit dem vorhandenen Mikrobiom. Diese dauerhafte Überwachung ist an jenen Stellen des Körpers am sinnvollsten, an denen eine intensive Interaktion mit Pathogenen

stattfindet (Nielsen et al. 2017). Neben IL-17^{+} γδ T Zellen gibt es eine weitere IFN-γ produzierende Unterform, auf die hier jedoch nicht weiter eingegangen wird (Ribot et al. 2009).
Antikörper gegen verschiedene Bestandteile der IL-17 Reaktionswege werden bereits erfolgreich im klinischen Alltag eingesetzt. Zur Behandlung der Psoriasis werden unterschiedliche Antikörper verwendet, welche sich direkt gegen IL-17A, IL-17F (Secukinumab, Ixekizumab, Bimekizumab) oder den IL-17 Rezeptor (Brodalumab) richten. Verschiedene Therapien gegen IL-23 als Induktor der IL-17 Produktion durchlaufen derzeit klinische Studien (Ustekinumab, Risankizumab, Tildrakizumab, Guselkumab) (Liu et al. 2020).

2.4.2 Gamma Delta T Zellen und Interleukin-17A im Schlaganfall

Interleukin-17A spielt eine wichtige Rolle in der Inflammation im Schlaganfall. Sowohl im Tiermodell als auch im Menschen lassen sich IL-17A produzierende Zellen innerhalb der ersten Tage nach ischämischem Ereignis nachweisen (Gelderblom et al. 2012, Li et al. 2005). Im Tiermodell findet die Infiltration von IL-17A produzierenden Zellen bereits nach 6 h statt, wobei der größte Anteil der IL-17A Produktion im Tiermodell von γδ T Zellen ausgeht. Sowohl in genetisch modifizierten Tieren ohne funktionsfähiges IL-17A, als auch in Wildtyp-Tieren, denen ein neutralisierender IL-17A Antikörper nach der Schlaganfallinduktion injiziert wurde, zeigen sich signifikant verringerte Infarktgrößen (Gelderblom et al. 2012, Shichita et al. 2009).

Einen wesentlichen Einfluss auf die Produktion von IL-17A durch γδ T Zellen hat IL-23, das sowohl von Makrophagen (Shichita et al. 2009), als auch Dendritischen Zellen produziert wird (Gelderblom et al. 2018). Im Mausmodell des ischämischen Schlaganfalls hatten transgene Tiere ohne funktionsfähiges IL-23 sowohl kleinere Infarkte, als auch eine geringere Menge an IL-17A und IFN-γ (Zheng et al. 2015). Derzeit liegen noch keine humanen Studien hinsichtlich der Rolle von IL-23 im Schlaganfall vor. Untersuchungen an Patienten mit Multipler Sklerose, als Beispiel einer chronischen Entzündung im ZNS zeigen jedoch eine wesentliche Beteiligung IL-23 produzierender dendritischer Zellen an der Inflammation (Li et al. 2007).

Ob IL-17A einen direkten schädigenden Effekt besitzt, ist derzeit noch nicht abschließend geklärt. Es konnte zwar in vitro gezeigt werden, dass Neurone IL-17-Rezeptoren tragen und unter verminderter Glukose- und Sauerstoffkonzentration bei gleichzeitig erhöhter IL-17A Konzentration vermehrt versterben (Wang et al. 2009). Der Hauptteil der schädigenden Wirkung im ZNS nach Ischämie scheint jedoch über die CXCL-1 vermittelte Invasion Neutrophiler Granulozyten vermittelt. IL-17A und TNF-α waren hierbei synergistisch an der astrozytären CXCL-1 Produktion beteiligt (Gelderblom et al. 2012). Eine reduzierte Anzahl infiltrierender Neutrophiler Granulozyten ist nicht nur unter pharmakologischer Inhibition von IL-17A zu finden, sondern ebenso bei transgenen Tieren, die auf Grund eines fehlenden CCR6 Rezeptors eine verminderte Infiltration IL-17A produzierender γδ T Zellen im Schlaganfallgebiet aufwiesen (Arunachalam et al. 2017). Die IL-17A abhängige CXCL-1 Produktion konnte ebenso in anderen pathologisch-inflammatorischen Zuständen im ZNS wie der EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis), einem murinen Modell der Multiplen Sklerose, nachgewiesen werden (Wojkowska et al. 2017).

Welchen langfristigen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des ZNS eine temporäre- oder auch chronische IL-17A Erhöhung nach zerebraler Ischämie hat, ist derzeit noch nicht abschließend geklärt. Auf der einen Seite erwies sich astrozytäres IL-17A einen Monat nach Schlaganfallinduktion mitverantwortlich für das Überleben und die weitere Differenzierung neuronaler Prekusorzellen (Lin et al. 2016). Auf der anderen Seite bewirkte eine erhöhte IL-17A Konzentrationen jedoch eine Abnahme der neuronalen Proliferation und Regenration innerhalb der ersten Tage nach eingetretener Ischämie in der Maus (Sun et al. 2020a, 2020b). In anderen Modellen einer chronischen Entzündung im ZNS, wie dem Mausmodell der Alzheimer Erkrankung führte eine erhöhte Konzentration von IL-17A zu einer verminderten synaptischen Plastizität und einem verschlechterten Kurzzeitgedächtnis (Brigas et al. 2021).

Insgesamt ergibt sich somit eine im initialen inflammatorischen Prozess des ischämischen Schlaganfalls pro-inflammatorische und schädigende Rolle des IL-17A. IL-17A fungiert hierbei als Mediator der Entzündungsreaktion mit wesentlichem Einfluss auf die Funktionsweise und Infiltration von den beteiligten

Zellen des Immunsystems. Die Rolle, die IL-17A darüber hinaus langfristig auch unabhängig der Inflammation in der Proliferation von Neuronen und der kognitiven Fähigkeit einnimmt, ist jedoch derzeit noch nicht abschließend verstanden und bedarf weiterer Forschung.

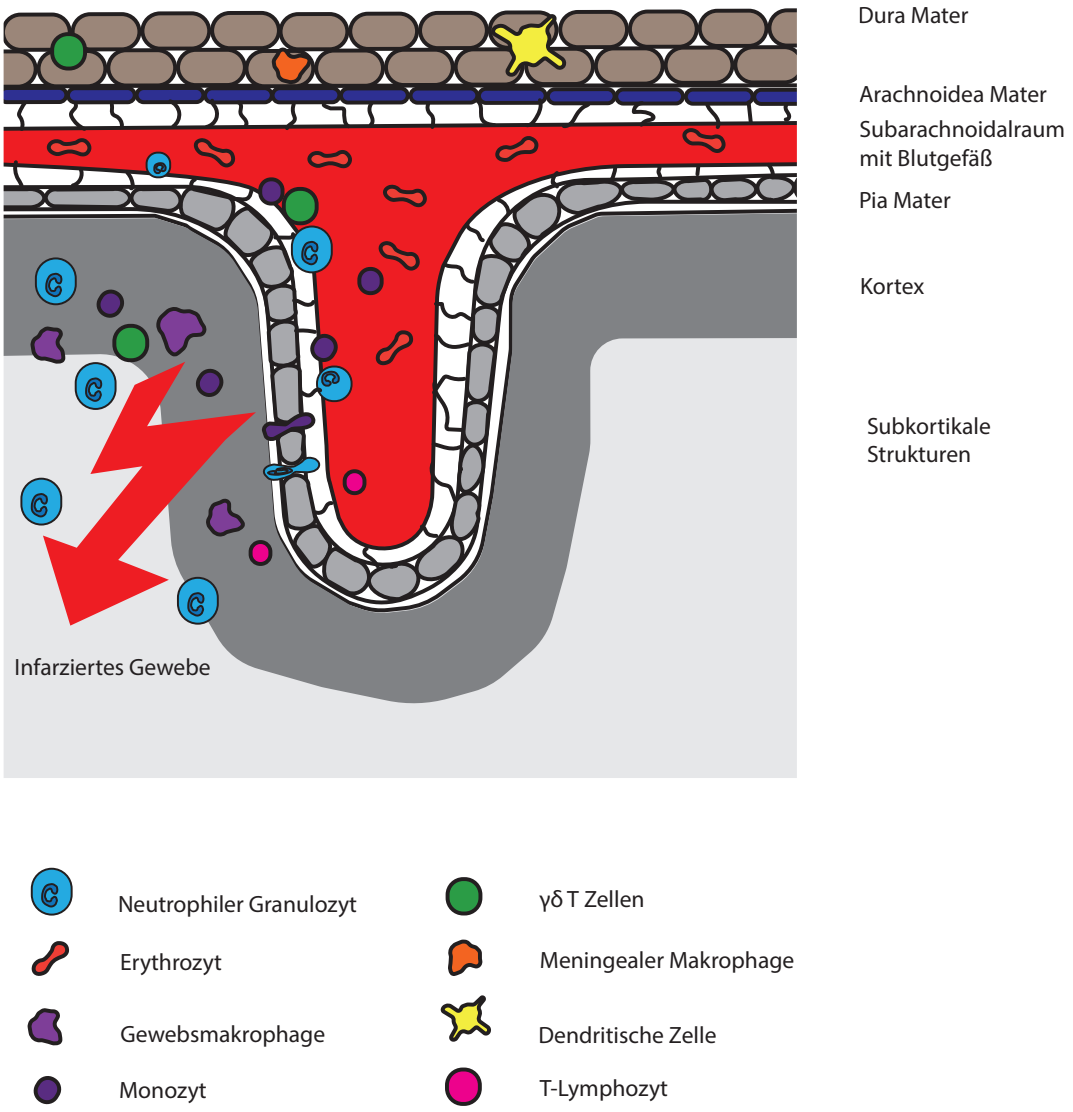

Abbildung 1: Graphische Übersicht der Inflammation im Schlaganfall. Monozyten, Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten infiltrieren über die geschädigte BBB innerhalb der ersten Tage in das Schlaganfallgebiet.

2.5 Die Fallstricke der Translationalen Medizin

2.5.1 Humane Studien zu Inflammation und Schlaganfall

In den letzten Jahren wurde die Wirksamkeit diverser immunmodulatorischer Medikamente zur Beeinflussung des Immunsystems in humanen Studien im ischämischen Schlaganfall überprüft.

Enolimomab, ein muriner ICAM-1 Antikörper, zeigte im Mausmodell erfolgsversprechende Ergebnisse. In einer humanen Phase III Studie wurden Patienten mit ischämischem Schlaganfall innerhalb von 6 Stunden mit Enlimomab behandelt und mit Patienten, die ein Placebo erhielten, verglichen. Es konnten weder positive Effekte auf die mRS, noch die Infarktgrößen oder das Gesamtüberleben festgestellt werden. Es ergaben sich im Gegenteil vermehrte Infektionen und gehäufte fieberhafte Infekte, was wesentlich auf die murine Herkunft des Antikörpers zurückzuführen war (Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators, 2001).

Fingolimod, ein Sphingosin 1-Phosphat Rezeptor Modulator, zeigte in den bisherigen Untersuchungen im ischämischen Schlaganfall vielversprechende Ergebnisse. Das Medikament ist bereits seit längerem in der Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose zugelassen. Es reduziert die Anzahl zirkulierender Lymphozyten im peripheren Blut durch die Verhinderung ihres Austritts aus den Lymphknoten (Matloubian et al. 2004). In einer ersten monozentrischen open-label Studie wurde Fingoliomd Patienten mit ischämsichem Schlaganfall verabreicht, die nicht für eine i.v. Thrombolyse in Frage kamen. 0,5 mg Fingolimod wurde an drei aufeinander folgenden Tagen oral verabreicht, als Kontrolle dienten vergleichbare Patienten mit der Standardbehandlung nach ischämischem Schlaganfall, eine Placebo Kontrollgruppe existierte jedoch nicht. Es zeigten sich signifikante Funktionsverbesserungen im NIHSS, dem mRS und dem Barthel Index, eine signifikant geringere Zunahme der Infarktvolumina an Tag 7 verglichen zur Baseline und eine signifikant reduzierte Anzahl peripherer Lymphozyten im Blut innerhalb der ersten Tage nach Schlaganfall (Fu et al. 2014). In zwei weiteren multizentrischen, randomisierten, open-label Studien wurde der Effekt von Fingolimod bei paralleler i.v. Lyse untersucht. Zum einen wurden

signifikant geringere Zunahmen der Infarktvolumina innerhalb der ersten sieben Tage gemessen. Zum anderen zeigten sich sowohl NIHSS, als auch mRS in beiden Untersuchungen signifikant gebessert (Zhu et al. 2015, Tian et al. 2018). Insgesamt zeigen die hier diskutierten Untersuchungen einen vielversprechenden Ansatz. Es ist jedoch zu beachten, dass in keiner der bisherigen Studien eine Placebo Gruppe als Kontrolle diente. Auch waren die Untersuchungen als Open-Label Experimente geplant, wodurch Störfaktoren, wie beispielsweise durch den untersuchenden Arzt, nicht auszuschließen sind. Derzeit wird eine weitere randomisierte, Placebo kontrollierte Multicenterstudie in Verbindung mit i.v. Lyse und mechanischer Rekanalisation durchgeführt (NCT04675762). Es bleiben daher die Ergebnisse dieser Studie abzuwarten, inwiefern die bisherigen positiven Daten auch unter einem standardisierten und methodisch korrekten Setting Bestand haben werden.

Minocyclin, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Tetracycline, besitzt neben seiner bakteriostatischen Wirkung einen über Mikroglia vermittelten neuro-protektiven Effekt (Zemke und Majid 2004, Kobayashi et al. 2013). Auf Basis der bisher durchgeführten klinischen Studien zur Beeinflussung des neurologischen Outcomes von Schlaganfallpatienten durch Minocyclin wurde eine Meta-Analyse erstellt. Anhand dieser Daten konnte zum einen festgestellt werden, dass Patienten, die Minocyclin erhielten, einen signifikant gebesserten funktionellen Zustand, gemessen am mRS, dem NIHSS und dem Barthel Index aufwiesen. Zum anderen ergaben sich keine Hinweise auf vermehrte unerwünschte Ereignisse in den Studiengruppen. Anhand dieser Daten ist daher von einem positiven Effekt von Minocyclin auf die Folgen einer zerebralen Ischämie auszugehen. Es fehlen jedoch größere, randomisierte und kontrollierte Studien um eine abschließende Beurteilung treffen zu können (Malhotra et al. 2018).

Imatinib, ein Tyrosin-Kinase Inhibitor, wurde ursprünglich für die Behandlung der Chronisch Myeloischen Leukämie entwickelt (Savage und Antman 2009). Im Tiermodell des Schlaganfalls schützt es Tiere durch eine Abnahme der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Su et al. 2008). In einer kleinen, randomisierten Phase II Studie mit verschiedenen Wirkdosen zeigten sich in der Gruppe mit der höchsten Dosis signifikant gebesserte NIHSS Scores. Die im Verlauf erhobenen mRS Werte unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander

(Wahlgren et al. 2017). Derzeit wird eine Phase III Multicenterstudie zur weiteren Beurteilung der Wirksamkeit und Sicherheit von Imatinib im ischämischen Schlaganfall durchgeführt (NCT03639922).

Natalizumab ist wie Fingolimod der Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose entliehen. Es wirkt über die Blockade des Integrin-a4, einem lymphozytären Adhäsionsmolekül (Polman et al. 2006). Frühe präklinische Daten zeigten neuroprotektive Effekte im Schlaganfallmodell der Maus (Liesz et al. 2011). Eine präklinische Multicenterstudie konnte protektive Effekte im permanenten, jedoch nicht transienten Schlaganfallmodell der Maus nachweisen (Llovera et al. 2015). Eine humane multizentrische Phase II Studie konnte keinen Effekt von Natalizumab auf die Infarktgrößen feststellen. Es zeigte sich jedoch ein positiver Trend für das neurologische Outcome (Elkins et al. 2017). In einer ergänzenden multizentrischen Phase IIb Studie konnten diese positiven Effekte jedoch nicht bestätigt werden (Elkind et al. 2020).

2.5.2 Transition präklinischer Daten in die Klinik

In den letzten Jahren wurde vermehrt der Frage nachgegangen, warum sich die Ergebnisse vieler Studien nicht reproduzieren ließen (Baker 2016). Ebenso wurde die Frage der fehlenden Translation präklinischer Daten in den klinischen Alltag immer stärker in den Fokus der Untersuchungen gerückt (Seyhan 2019, Boltze et al. 2014). Insbesondere in der Forschung neuer Therapiemöglichkeiten im ischämischen Schlaganfall stellt die schlechte Translation ein wesentliches Problem dar (Lourbopoulos et al. 2021, Schmidt-Pogoda et al. 2020).

Die fehlende Reproduzierbarkeit von Daten ist nicht nur in der Medizin, sondern auch in anderen akademischen Fächern wie der Physik, der Chemie, der Psychologie oder den Sozialwissenschaften ein relevantes Problem (Baker 2016). Diese hohe Relevanz folgt insbesondere daraus, dass grundsätzlich davon ausgegangen wird, dass Experimente, sofern unter gleichen und kontrollierten Bedingungen durchgeführt, auch zu gleichen Ergebnissen führen. Eine solche Annahme stellt einen wesentlichen Aspekt der Weiterentwicklung wissenschaftlicher Theorien und Modelle dar und ist essentiell für den gesamtgesellschaftlichen langfristigen Wissensaufbau.

Die Frage nach den Gründen der schlechten Translation und ungenügenden Reproduzierbarkeit ist bisher nur unzureichend beantwortet (Dirnagl et al. 2013), es scheinen jedoch verschiedene Teilaspekte einen Einfluss zu haben, wie beispielsweise eine fehlerhafte statistische Auswertungen der Daten, eine ungenügende Verblindung von Gruppen und Wissenschaftlern während der Datenerhebung und -auswertung, das fehlende Publizieren negativer Resultate, die fehlende Veröffentlichung von Rohdaten bzw. Fehlen dieser und fehlende a priori durchgeführte Power Analysen. Diese Kernaspekte wissenschaftlichen Arbeitens sollten bei der Durchführung von präklinischen Schlaganfallstudien daher vermehrte Beachtung finden (Boltze et al. 2014, Lourbopoulos et al. 2021). Auch andere Aspekte können relevante Einflussfaktoren auf die Reproduzierbarkeit von Daten haben wie beispielsweise der Ort der Durchführung der Untersuchung selbst. So konnte bereits vor längerem aufgezeigt werden, dass unter strenger Kontrolle aller weiteren Einflussfaktoren allein die Laborumgebung einen signifikanten Einfluss auf Testverfahren bei Mäusen hat (Crabbe 1999). Dementsprechend führen homogene Laborumgebungen, insbesondere wenn nur in einem einzigen Labor durchgeführt, zu dem Problem einer deutlich verminderten externen Validität der Daten (Richter, 2009). Vermehrte Heterogenität zur Erhöhung der externen Validität kann daher u.a. durch Durchführung der Untersuchung in verschiedenen Laboren gewonnen werden (Voelkl et al. 2018). In der experimentellen Schlaganfallmedizin ist bisher lediglich eine solche präklinische Multicenterstudie geplant und durchgeführt worden, in der Tiere mit kleinen, kortikalen Infarkten von der Behandlung profitierten (Llovera et al. 2015). Zur Verbesserung dieser „Bench to Bedside“ Probleme sind daher weitere präklinische Multicenterstudien notwendig (Dirnagl et al. 2013).

3 Methoden

3.1 Mauslinien und Tierhaltung

Für die Studie wurden Wild Typ Mäuse der Linien C57Bl/6J und C57Bl/6JBomTac verwandt. Die beiden Subtypen haben einen gemeinsamen Ursprung, wobei die Linie C57Bl/6JbomTac seit dem Jahr 1971 als eigene Unterform, zunächst unter dem Namen C57Bl/6Jhan und erst später unter dem Namen C57Bl/6JbomTac, weitergezüchtet wurde (Low-Marchelli 2017). Die Tiere zeichnen sich durch einen hohen Grad an genetischer Stabilität aus und sind auch in den bisherigen Untersuchungen bezüglich der Rolle von IL-17A im Schlaganfallmodell der Maus verwandt worden (Gelderblom et al. 2012). Die teilnehmenden Studienzentren konnten den jeweiligen Züchter der Mäuse selbst wählen. Zwei Studienzentren bezogen ihre Tiere von Charles River (Hamburg und Münster), ein Studienzentrum von The Jackson Lab (New York) und ein weiteres von Taconic (Odense). Die Tiere wurden unter vergleichbaren Kriterien untergebracht. Es gab einen regelmäßigen Tag–Nacht-Zyklus von je zwölf Stunden, eine Behausung in IVC-Racks mit kontinuierlicher Frischluftzufuhr innerhalb eines geschlossenen Systems, eine kontrollierte Raumtemperatur von 20 bis 24°C sowie ausreichend zur Verfügung gestelltes Nistmaterial. Sofern möglich, wurden die Mäuse in Gruppen von bis zu fünf Tieren gehalten. Der Studieneinschluss erfolgte in einem Alter von 11 bis 13 Wochen und einem Gewicht von 24 bis 28g. Es wurden ausschließlich Böcke verwendet. Bevor die Mäuse in die Studie eingeschlossen wurden, verblieben sie für mindestens zwei Wochen in den jeweiligen Behausungen um eine adäquate Anpassung zu gewährleisten.

3.2 tMCAO

Die Induktion einer zerebralen Ischämie im Nagetiermodell kann mit Hilfe dreier verschiedener Methoden durchgeführt werden: der transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO), der permanent middle cerebral artery occlusin (pMCAO) und dem photothrombotischen Verschluss.

Die Entscheidung der Wahl der OP-Methode hängt zum einen von den Möglichkeiten des Labors, zum anderen jedoch auch von der zu untersuchenden Pathophysiologie ab. In der durchgeführten Studie haben wir uns für die tMCAO

entschieden, einer bereits seit langer etablierter und vielfach durchgeführter Methode (Gelderblom et al. 2009, Arumugam et al. 2006). Tiere, denen mittels tMCAO ein Schlaganfall zugefügt wird, haben im Vergleich zu den anderen beiden Methoden zusätzlich einen Reperfusionsschaden. Dieser entsteht, wenn ein sich zuvor verschlossenes Gefäß wiedereröffnet und es so zu einer Hyperämie mit konsekutivem Gewebeschaden kommt. Durchschnittlich sind solche Infarkte, die durch tMCAO verursacht werden, größer und schließen subkortikale Strukturen mit ein.

Die Tiere wurden für die Operation zunächst mittels Isofluran in Narkose versetzt (Einleitung der Narkose mit 5% Isofluran bei einem Flow von 0,5L O2/Minute). Zur perioperativen Schmerztherapie wurde 100 µl Buprenorphin s.c. injiziert. Anschließend wurden die Tiere auf einer Wärmematte gelagert, die die perioperative Auskühlung verhinderte. Die Körpertemperatur der Tiere wurde fortwährend über eine rektale Temperatursonde überwacht und bei 37°C gehalten. Perioperativ verblieben die Tiere unter Isoflurannarkose mit einer Konzentration von 2-4%. Die Narkosetiefe wurde anhand der Atemfrequenz fortwährend überprüft. Vor dem Beginn der Operation wurde über die fehlende Auslösbarkeit des Zwischenzehenreflexes eine adäquate Analgosedierung sichergestellt.

Der ventrale Nacken wurde zur Herstellung eines operativen Zugangswegs rasiert, ein wenige Zentimeter langer Längsschnitt inzisiert und solange vorsichtig in die Tiefe präpariert, bis die Halsgefäße ersichtlich waren. Nun wurden die Gefäße einzeln abgebunden um Blutungen zu verhindern. Zunächst wurde die Arteria carotis communis (ACC) aufgesucht und mit einem wieder zu öffnenden Knoten abgebunden, gleiches geschah mit der proximalen Arteria carotis externa (ACE) sowie der Arteria carotis interna (ACI). Ein zweiter Knoten in distaler Richtung wurde an der ACE angebracht, welcher im Gegensatz zum ersten dauerhaft verblieb (*Vgl. Abbildung 2*). Im Anschluss erfolgte ein Einschnitt der ACE in Längsrichtung in welches ein Silikon-behaftetes Monofilament eingeführt wurde (Doccol: Filament # 602112PK10). Dieses wurde unter leichtem Lockern des proximalen ACE Knotens zunächst in die ACC vorgeschoben und daraufhin der proximale ACE Knoten erneut festgezogen, um eine Translokation des Filaments zu unterbinden. Die verbliebene ACE wurde nun dauerhaft zwischen den beiden Knoten getrennt, sodass das Ende

des Filaments nach unten geklappt werden konnte. Es folgte, nach der Eröffnung des ACI Knotens, ein langsames Vorschieben des Filaments entlang der ACI bis auf Höhe der Arteria cerebri media (ACM), wo dieses für 45 Minuten verblieb. Nach Abschluss wurde das Filament vorsichtig zurückgezogen und aus dem Gefäßsystem entfernt, sodass der vorhandene Stumpf der ACE dauerhaft verschlossen werden konnte und die Blutversorgung des Gehirns über die ACC und ACI wieder sichergestellt war (*Vgl. Abbildung 2*). Es erfolgte eine Muskel- und Hautnaht, die Wundfläche wurde mit Betaisodonna eingerieben um sekundäre Infektionen zu verhindern. Die Mäuse wurden anschließend zurück in ihren Käfig verbracht und erwachten kurze Zeit später aus der Narkose.

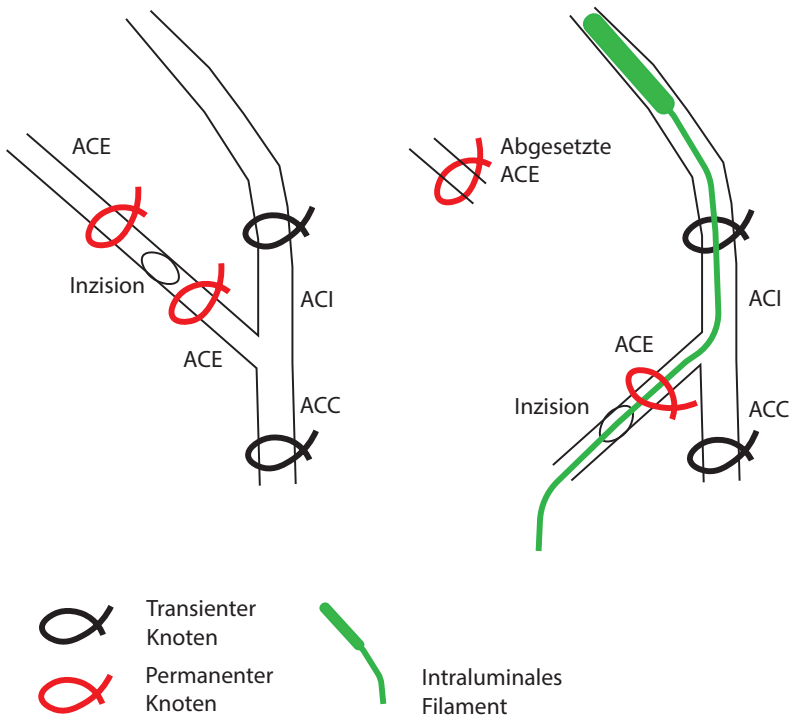

Abbildung 2: Skizze der tMCAO Operation. Nach transienter Unterbindung des Blutflusses der Arteria carotis communis (ACC), der Arteria carotis externa (ACE) und der Arteria carotis interna (ACI) sowie dem permanenten distalen Verschluss der ACE erfolgt eine Inzision zwischen den beiden Knoten der ACE. In diesen wird, nach umklappen der Arterie nach distal ein Filament eingeführt, welches bis zur Arteria cerebri media (ACM) vorgeschoben wird und hier für 45 Minuten verbleibt. Im Anschluss werden die transienten Knoten entfernt.

3.3 Antikörper

Jeweils 500 µg anti-IL17A Antikörper (3.33 µg/µl, Clone MM17F3, eBioscience) oder 500 µg IgG1 Isotyp Kontroll Antikörper (3.33 µg/µl, IgG1) wurden je Maus injiziert, gelöst in 150 µl PBS. Die Antikörper Alliquotierung und Verblindung erfolgte in Hamburg. Der Versand erfolgte sodann gekühlt und nummeriert an die einzelnen Studienzentren.

3.4 Scoring und Verhaltenstests

Im Anschluss an die Operation wurden die Mäuse in regelmäßigen Abständen körperlich untersucht und ihr Verhalten erfasst. Dies diente zum einen der Sicherstellung des Tierschutzes und zum anderen der Verhaltensbeurteilung als Variable der Antikörperbehandlung.

Die Einschätzung der Belastung der Tiere erfolgte während der Durchführung der Studie zwei Mal täglich. Dies beinhaltete u.a. die Ermittlung des Körpergewichts, eine Begutachtung der Wundverhältnisse, des Allgemeinzustandes und der generellen Körperfunktionen. Die motorischen Fähigkeiten wurden anhand des Bederson Scores überprüft. Dieser ist ein seit vielen Jahren in der Untersuchung der Schlaganfallfolgen nach tMCAO etabliertes Instrument und im Verhältnis mit wenig Aufwand durchzuführen (Bederson et al. 1986). In dieser Studie wurde eine abgewandte Version mit fünf statt drei Stufen verwandt, da hierdurch verlässlich zwischen Gruppen mit großen und kleinen Infarkten unterschieden werden konnte (Bieber et al. 2019). Auf Stufe 0 ist kein Defizit erkennbar, auf Stufe 1 bewegt sich das Tier in eine präferierte Richtung, auf Stufe 2 ist ein Zirkeln zu erkennen, auf Stufe 3 ein Rollen in Richtung der Längsachse, auf Stufe 4 ist keine Bewegung mehr zu beobachten und Stufe 5 entspricht dem Tod. Die motorischen Verhaltenstests wurden täglich morgens zur gleichen Uhrzeit durchgeführt um die Versuchsbedingungen möglichst konstant zu halten.

3.5 Tierschutz

Alle Experimente wurden anhand der Maßgaben der „Guides 36 of the Care and Use of Laboratory Animals“ geplant und durch die jeweils zuständigen Behörden genehmigt (NRC 2011). Die Durchführung erfolgte unter Berücksichtigung der ARRIVE Guidelines für Tierstudien (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments; http://www.nc3rs.org/ARRIVE). Vorab wurden Belastungstabellen erstellt und Kriterien für den Ausschluss einzelner Tiere festgelegt.
Um die Belastung während der Studie so gering wie möglich zu halten, wurde bereits prä-operativ mit der oralen Gabe von Tramadol über das Trinkwasser begonnen, dieses wurde auch in den folgenden Tagen weitergegeben. Zeigten die Tiere postoperativ Anzeichen von Schmerzen, wurde zusätzlich mit Buprenorphin

s.c. therapiert. Nach dem Schlaganfall wurde den Tieren gesüßtes Weichfutter angeboten um die Nahrungsaufnahme zu erleichtern. Bei einer Gewichtsabnahme über 10% erfolgte die i.p. Injektion von NaCl 0,9% in körpergewichtsadaptierter Dosis. Solche Tiere, die über 20% ihres Gewichts verloren hatten, ein apathisches Verhalten oder Krämpfe zeigten, stark unterkühlt oder dehydriert waren oder sich auf Grund der Beeinträchtigung durch den Schlaganfall nicht mehr selbstständig fortbewegen konnten zwecks Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, wurden aus dem Experiment genommen und eingeschläfert.

3.6 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein bildgebendes Verfahren, welches auf der Anregung und der damit verbundenen Neuausrichtung und Relaxation von magnetischen H^+ Ionen im Gewebe basiert. Dies ermöglicht eine anatomisch hochauflösende Darstellung von Strukturen, insbesondere im Vergleich zu anderen Methoden wie der Computertomographie. In der neurologischen Diagnostik ist die MRT aus dem Alltag nicht mehr wegzudenken, da sie beispielsweise eine herausragende Sensitivität in der Detektion ischämischer Ereignisse besitzt.

Für die Schlaganfall-Bildgebung werden unterschiedliche, im Folgenden diskutierte Sequenzen verwandt, die es ermöglichen zwischen bereits demarkiertem Infarkt und frisch infarziertem Gewebe zu unterscheiden (Thomalla et al. 2011). Ein bereits demarkierter Infarkt wird durch FLAIR (Fluid attenuated inversion recovery) Sequenzen detektiert, in der die sich im Gewebe befindende Flüssigkeit hyperintens, die übrige jedoch hypointens dargestellt wird. In diffusionsgewichteten Sequenzen (Diffusion weighted images, DWI) lassen sich ischämische Läsionen bereits sehr früh abbilden, innerhalb weniger Minuten nach Eintritt des Infarkts. Die DWI Sequenzen bilden jenen Anteil des infarzierten Gebietes ab, in dem es auf Grund des Zusammenbruchs des physiologischen Ionengradienten zu einer Verschiebung des extrazellulären Wassers in den Intrazellularraum kommt. Diese Flüssigkeitsverschiebungen stellen sich in der MRT Bildgebung zumeist, jedoch nicht immer hyperintens dar. Es sind verschiedene DWI Sequenzen verfügbar, u.a. die ADC (Apparant Diffusion Coefficient). In dieser Sequenz sind zerebrale Ischämien bereits sehr früh hypointens zu detektieren, korrelierend in Größe und Lokalisation mit dem Infarktkern (Schaefer et al. 2000). MRT Bildgebung ist nicht

nur im Menschen, sondern auch in anderen Wirbeltieren möglich. Zur Schlaganfallgrößenbestimmung im Mausmodell können diese Techniken ebenfalls herangezogen werden (Ramos-Carbrer et al. 2018).

Zur Bestimmung der Infarktgrößen in unserer Studie wurden die Tiere nach der Tötung zunächst mit 25 ml PBS und anschließend 25 ml PFA 4% perfundiert. Im Anschluss wurden die Gehirne entnommen und zunächst für weitere 24 Stunden in 4% PFA belassen. Im Folgenden wurden diese in PBS überführt und auf 4°C gekühlt in das Studienzentrum in Hamburg versandt. Für die eigentliche Bildgebung wurden die Gehirne in PBS gefüllte 15 ml Falcons überführt und in den MRT Scanner verbracht. Die Gehirne aus Münster, Odense und New York wurden in einem 7 Tesla Bruker ClinScan Gerät gemessen, die Hamburger Proben wurden nach Münster versandt und mit Hilfe eines 9,4 Tesla Bruker BioSpec System untersucht. Das untersuchte Set von Bildern bestand aus coronaren T2, DWI und ADC Sequenzen mit einer jeweiligen Schichtdicke von 0,5 mm.

3.7 Auswertung der MRT Daten

Die Auswertung der Infarktgrößen wurde mit Hilfe von ImageJ durchgeführt. Die aufgenommenen Sequenzen wurden als Einzelbilder in einem Stack gespeichert und in ImageJ eingefügt. Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte manuell für jedes aufgenommene Bild anhand der ADC Sequenzen. Der infarzierte Bereich wurde markiert, die Flächen jedes Gehirns addiert und mit 0,5 multipliziert um das Infarktvolumen zu erhalten. Im Anschluss erfolgte eine Ödemkorrektur, um die realen Infarktvolumina nicht zu überschätzen (Gerriets et al. 2004). Um ein valides Ergebnis zu erhalten wurde die Infarktgrößenbestimmung durch zwei unabhängige und verblindete Wissenschaftler durchgeführt.

3.8 Einbettung und Schneiden der Gehirne

Nach Abschluss der MRT Messung wurde jedes Gehirn in Paraffin eingebettet um dieses für die anschließende Histologie weiterverarbeiten zu können. Die Einbettung erfolgte in rostral-kaudaler Ausrichtung um im Anschluss coronare Schnitte, äquivalent zu den MRT Bildern zu erhalten. Das Schneiden der eingebetteten Gehirne erfolgte mit Hilfe eines Mikrotoms auf Raumtemperatur

(Leica SM 2010 R). Das Ende des Bulbus olfaktorius diente als Landmarke für den ersten zu verwendenden Schnitt, welcher zunächst mit Hilfe eines Pinsels in kaltem Wasser abgelegt wurde. Nach der anschließenden Entfaltung der Schnitte in 37°C warmen Wasser erfolgte deren Aufnahme mit positiv geladenen Objektträgern, welche sodann auf einer Wärmeplatte zur Trocknung abgelegt wurden.

Die Schichtdicke betrug 10 µm, an jeder Position wurden 5 Schnitte für unterschiedliche Zwecke angefertigt. Nach dem jeweils 5. Schnitt wurde 350 µm des Materials verworfen, um zur nächsten Stelle zu gelangen. Insgesamt wurden so für jedes Gehirn 15*5 Schnitte unterschiedlicher Lokalisation generiert. Auf jedem Objektträger wurden drei Schnitte gesammelt, die drei konsekutiven Positionen im Gehirn entsprachen.

3.9 Neutrophilenfärbung

Für die Anfärbung der Neutrophilen Granulozyten mussten die Hirnschnitte zunächst deparaffinisiert und anschließend rehydriert werden. Hierfür wurden diese in Xylol-Ersatzmittel, Ethanol in absteigender Konzentration, Wasser und abschließend in PBS-Tween 0,05% inkubiert. Es erfolgte ein Antigen-Retrieval in erhitztem, jedoch nicht sidendem Citrat-Puffer für 20 Minuten. Nach Unterbindung unspezifischer Peroxidase Reaktionen durch 0,3% H_2O_2 erfolgte die Zugabe von Kaninchen-Serum (blocking solution, Vectastain Kit Elite ABC) für 45 Minuten zum Blocken unspezifischer Bindungen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen Ly6g auf 4°C für 12 Stunden (Ratte-Anti-Maus, Biolegend 127620; 1:500 in blocking solution). Nach der Inkubation mit dem biotinyliertem sekundären Antikörper für 45 Minuten auf Raumtemperatur (Kaninchen-Anti-Ratte, 1:200, Vectastain Kit Elite ABC) erfolgte die Zugabe der Peroxidase Reagenz für weitere 45 Minuten und des Peroxidase Substrats zur abschließenden Darstellung der gebundenen Antikörper. Die Hirnschnitte wurden mit Nuclear Fast Red zur Darstellung der Nuklei für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit Ethanol in aufsteigender Reihenfolge und Xylol Ersatzmittel dehydriert. Zwischen den einzelnen Schritten fanden jeweils ausführliche Waschschritte mit PBS-Tween 0,05% statt.

3.10 Scannen und Zählen der Zellen

Die Hirnschnitte auf den Objektträgern wurden mit Hilfe eines digitalen Slide Scanners mit einer 40x Vergrößerung aufgenommen und digitalisiert (Hamamatsu; Nano Zoomer). Die Auswertung der Bilder erfolgte sodann im NDP Viewer (Hamamatsu).
Für jedes Gehirn wurden Schnitte der 15 konsekutiven Positionen komplett beurteilt und die Menge Neutrophiler Granulozyten gezählt. Hierbei wurde zwischen ipsi- und kontralateralen sowie kortikalen- und subkortikalen Ly6G-positiven Zellen unterschieden. Jede einzelne Zelle wurde markiert um ein doppeltes Zählen zu verhindern. Die Gesamtzahl der Neutrophilen Granulozyten wurde anhand des ausgezählten Teilbereichs berechnet (Gesamtzahl der Ly6G-positiven Zellen/Gehirn= $(n_1+n_2+...n_i) \times 40$ Mit n_i=Anzahl der Neutrophilen an Position i). Da alle 400 µm ein Schnitt von 10 µm Dicke ausgezählt wurde, musste die Gesamtzahl mit 40 multipliziert werden. Bilder von repräsentativen Neutrophilen wurden mit einem Transmissionslichtmikroskop (Apotome, Zeiss) und einem 63x planapochromatischen Öl-DIC-Objektiv aufgenommen.

3.11 Statistik

Wir haben eine verallgemeinerte lineare gemischte Modellanalyse (SPSS, IBM, © 2019) berechnet, um die Behandlungseffekte auf das Infarktvolumen zu testen. Dieses Modell ermöglichte es uns, zwei Beurteiler als zufällige Effekte zu berücksichtigen. Feste Effekte wurden als Behandlung und Zentrum festgelegt, um paarweise Kontraste zwischen den Behandlungsgruppen für jedes Zentrum berechnen zu können. Die Normalverteilung wurde zuvor durch eine Histogramm Analyse visuell überprüft. Für die paarweisen Vergleiche wurden die p-Werte nach Šidák korrigiert. Jede Probe wurde von zwei unabhängigen Beurteilern in eine der beiden Untergruppen (mit und ohne kortikalen Infarkt) unterteilt. Innerhalb jeder Untergruppe führten wir die gleiche Analyse durch wie in der Hauptgruppe. Pearsons r wurde für die Interrater-Reliabiliät berechnet. Die Mortalität wurde mit einem Log-Rank-Test analysiert. Die Bederson Scores wurden mit einem Mann-Whitney-Test auf nicht parametrische Daten analysiert und das Körpergewicht wurde unter Verwendung einer gemischten Modellanalyse analysiert, um fehlende Werte mit Zeitpunkten und Behandlungen als festen Effekten zu berücksichtigen.

Auch hier erfolgte bei mehrfachem Testen eine Šidák-Korrektur. Die Anzahl der Neutrophilen aus der immunhistochemischen Analyse wurde mit einer multivariaten Varianzanalyse mit wiederholten Varianzmessungen mit anatomischen Kompartimenten und unterschiedlichen Behandlungen als unabhängige Variablen analysiert, es fand erneut eine Šidák-Korrektur bei mehrfachem Testen statt. In allen Tests wurde der Alpha-Wert auf 0,05 festgelegt. Wenn nicht anders angegeben, wurde GraphPad Prism 8 für die Analyse verwendet.

3.12 Liste der verwendeten Gerätschaften und Programme

1. Magnetresonanztomographen (MRTs):
    1. Bruker ClinScan 7 Tesla © für die Messung der Hirne aus Odense, New York und Münster
    2. Bruker BioSpec 9,4 Tesla © für die Messung der Hirne aus Hamburg
2. Mikroskope:
    1. Hamamatsu Nano Zoomer © in 40x Auflösung für die automatisierte Aufnahme der geschnittenen Gehirne zur Bestimmung der Anzahl infiltrierender Neutrophiler Granulozyten
        1. NDP Viewer, Hamamatsu © zur manuellen Bestimmung der Anzahl der Neutrophilen Granulozyten
    2. Zeiss Axiovert M200 © mit ApoTome mit einem 63x planapochromatischen Öl-DIC-Objektiv zur Detailaufnahme einzelner Neutrophiler Granulozyten
3. Mikrotom Leica SM 2010 R © auf Raumtemperatur für das Schneiden der in Paraffin eingefassten Gehirne, Schichtdicke 5 µm
4. SPSS, IBM, © 2019 zur Berechnung der verallgemeinerten linearen gemischten Modellanalyse
5. ImageJ, Version 1.51, © 2015 zur Bestimmung der Infarktgrößen und Bearbeitung der mikroskopischen Aufnahmen der Neutrophilen Granulozyten
6. Prism GraphPad 8, © 2018 für die statistischen Analysen
7. Adobe Illustrator © 2021 für die Erstellung der Vektorgraphiken

3.13 Liste der Verbrauchsmaterialien

1. anti-IL17A Antikörper, 3.33 µg/µl, Clone MM17F3, gelöst in PBS (eBioscience ©)
2. Buprenorphin, 0,015 µg/µl, gelöst in PBS (Indivior Europe limited©)
3. Citrat-Puffer (10mM, ph=6)
    1. Stock solution:
        1. A: 21,01g Zitronensäure ($C_6H_8O_7$-H_2O) in 1000ml $_dH_2O$
        2. B: 25,8g Natriumcitrat dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7$-$2H_2O$) in 1000ml dH_2O
    2. Working solution:
        1. 18 ml A + 82 ml B + 900 ml dH_2O
4. Ethanol in verschiedener Konzentration (Chemsolute ©)
    1. 100%, 96%, 70%, 50%
5. IgG1 Kontroll Antikörper, 3.33 µg/µl, gelöst in PBS (Bioexcell ©)
6. Isofluran 1000 mg/g (Baxter ©)
7. Natriumchlorid 0,9% (Braun Pharmaceutics ©)
8. Nuclear Fast Red (Sigma Aldrich ©)
9. PBS-Tween 0,05% (Serva Electrophoresis GmbH ©)
    1. 1999 ml PBS + 1 ml Tween® 20
10. PBS-Tween 0,2% (Serva Electrophoresis GmbH ©)
    1. 1996 ml PBS + 1 ml Tween® 20
11. Phosphatgepufferte Salzlösung (Sigma ©)
12. Paraformaldehyd 4% (Riedel de Haen ©)
13. Vectastain Elite ABC Kit (Vector ©)
    1. Kaninchen-Serum als Block-Lösung (Vector ©)
    2. Primärer Antikörper gegen Ly6G (Ratte-Anti-Maus, 127620; 1:500 in Block Lösung, Biolegend ©)
    3. Biotinylierter sekundärer Antikörper (Kaninchen-Anti-Ratte, 1/200, Vector ©)
14. Xylol-Ersatzmittel (DiaTec ©)

4 Ergebnisse

4.1 Studiendesign

Die Studie wurde als präklinische, randomisierte Placebo-kontrollierte Multicenterstudie geplant und weltweit in vier Studienzentren durchgeführt.

Die Initiierung, Planung und organisatorische Durchführung erfolgte durch das primäre Studienzentrum, die Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die weiteren Studienzentren waren die Klinik für Neurologie mit dem Institut für translationale Neurologie der Uniklinik an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster in Deutschland, das Department of Neurobiology Research and Department of Molecular Medicine, Syddansk Universitet, Odense in Dänemark sowie das Weill Cornell Medicine Feil Family, Brain & Mind Research Institute der Cornell University in New York, Vereinigte Staaten von Amerika. Die Kliniken wurden durch das Hamburger Studienzentrum eingeladen, die Teilnahme war freiwillig und unentgeltlich auf Basis einer Kooperation. Die Finanzierung der Antikörper, MRTs, und Analysen erfolgte durch das Hamburger Studienzentrum wobei die Kosten der verwendeten Mäuse, des notwendigen Personals und der alltäglichen Verbrauchsmaterialen durch die jeweiligen Zentren getragen wurden. Die notwendigen anti-IL-17A und IgG-Kontroll Antikörper wurden von dem Hamburger Studienzentrum gestellt. Diese wurden verblindet und nummeriert an die drei weiteren Studienorte versandt.

Die chirurgisch arbeitenden Wissenschaftler waren erfahren hinsichtlich der Durchführung der Operation. Die OP-Dauer wurde so kurz wie möglich gehalten, die reine Ischämie-Zeit betrug 45 Minuten. Eine Stunde nach der Reperfusion erfolgte die i.v. Injektion der verblindeten, in PBS gelösten Antikörper. Sämtliche Operationen wurden morgens zur gleichen Zeit durchgeführt, sodass eine Vergleichbarkeit der Untersuchungen gewährleistet werden konnte.

Die Mäuse wurden 72 Stunden nach der tMCAO Operation mittels Isofluran oder CO_2 Narkose geopfert und im Anschluss mit PBS und PFA perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen, über weitere 24 Stunden in PFA belassen und in PBS auf 4°C gekühlt nach Hamburg versandt. In Hamburg erfolgten die MRT-Aufnahmen sowie

deren anschließende Auswertung. Bis zum Abschluss der Auswertung waren sämtliche Wissenschaftler, Pfleger und alle weiteren beteiligten Personen verblindet.

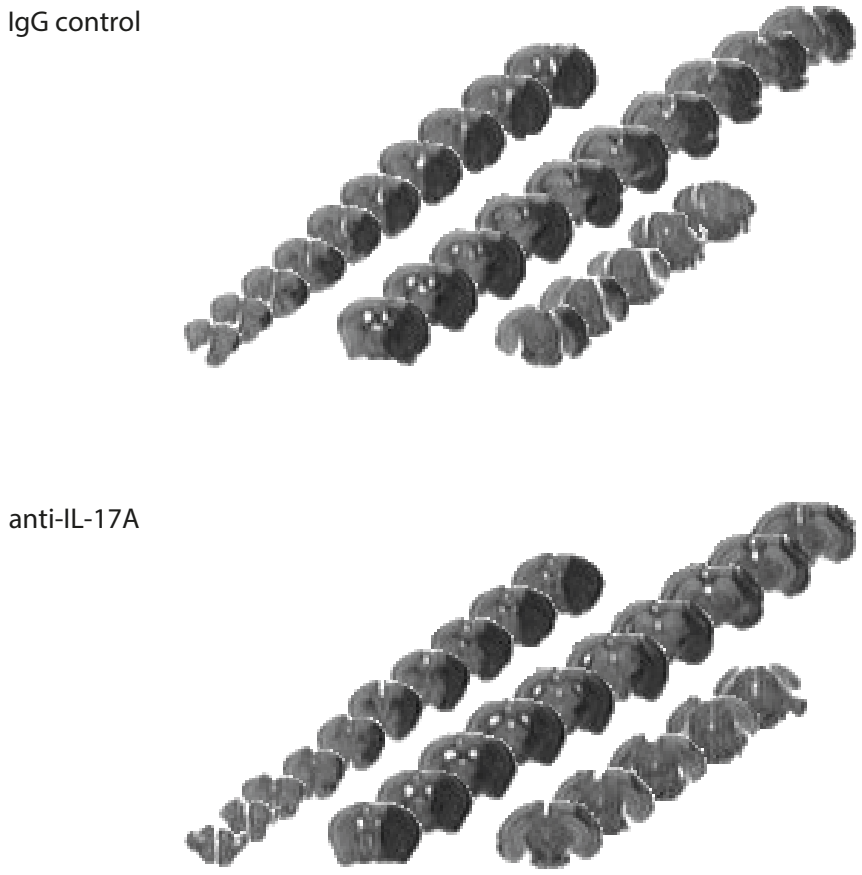

Abbildung 3: Einzelne Schichten der ADC Sequenzen in coronarer Schnittbildgebung, welche zur Auswertung der Infarktgrößen herangezogen wurden. Gezeigt sind sowohl Daten der Kontroll- als auch der Treatment Gruppe.

Vor Beginn der Studie erfolgte die Festlegung der primären- und sekundären Outcome Parameter und der prä-analytischen wie analytischen Ausschlusskriterien. Die primäre Outcome Variable wurde definiert als das Infarktvolumen am dritten postoperativen Tag in mm^3. Die Bestimmung der Infarktgrößen erfolgte anhand post-mortem durchgeführter ADC Aufnahmen (*Abbildung 3*). Die sekundären Outcome Variablen wurden definiert als Mortalität bis zum dritten Tag, das motorische Verhalten an Tag eins und drei sowie der Anzahl infiltrierender Neutrophiler Granulozyten an Tag drei, gemessen in der Immunhistologie.

Die prä-analytischen Ausschlusskriterien für die Auswertung der primären Outcome Variable waren der Tod vor dem definierten Endpunkt an Tag drei, eine peri-operative Körpertemperatur außerhalb des Bereiches von 36,5 bis 37,5°C und eine Verminderung des ipsilateralen Blutflusses von weniger als 80% während des einliegenden Filaments. Die analytischen Ausschlusskriterien wurden definiert als relevante Destruktion des Gehirns nach dessen Entnahme, einer sichtbaren parenchymatösen- oder subarachnoidalen Blutung, fehlendem Infarkt in der MRT oder einem reinen Hirnstamminfarkt.

Die Gruppengrößen wurden a priori mit Hilfe einer Power Analyse berechnet (Einseitige Verteilung, Power 0,95). Die Gruppengröße wurde auf 17 Tieren je Treatment-Gruppe und Zentrum festgelegt, sodass eine Gesamtzahl von 136 Mäusen in die Studie eingeschlossen wurde.

4.2 Studienverlauf und deskriptive Daten

Insgesamt wurden 136 Böcke in die Studie eingeschlossen, die zu gleichen Teilen entweder 500 µg anti-IL-17A Antikörper oder IgG1-Kontroll Antikörper erhielten (*Abbildung 3*).
Den primären Endpunkt erreichten 123 Mäuse, 65 aus der Treatment- und 58 aus der Kontrollgruppe. Drei Tiere, die das anti-IL-17A Treatment erhielten verstarben frühzeitig, in der Kontrollgruppe waren dies zehn. In die finale Analyse der primären Outcome Variable wurden schließlich 109 Tiere eingeschlossen, 57 aus der Treatment- und 52 aus der Kontrollgruppe. In der anti-IL-17A Gruppe wurden zwei Tiere aufgrund perioperativer Komplikationen ausgeschlossen, zwei aufgrund sichtbarer Blutungen, drei aufgrund fehlender Infarkte in der MRT und eine aufgrund nicht auswertbaren Materials. In der Kontrollgruppe wurden insgesamt sechs Tiere ausgeschlossen, zwei aufgrund einer sichtbaren Blutung, eine aufgrund eines fehlenden Infarkts in der MRT und drei aufgrund nicht auswertbaren Materials.

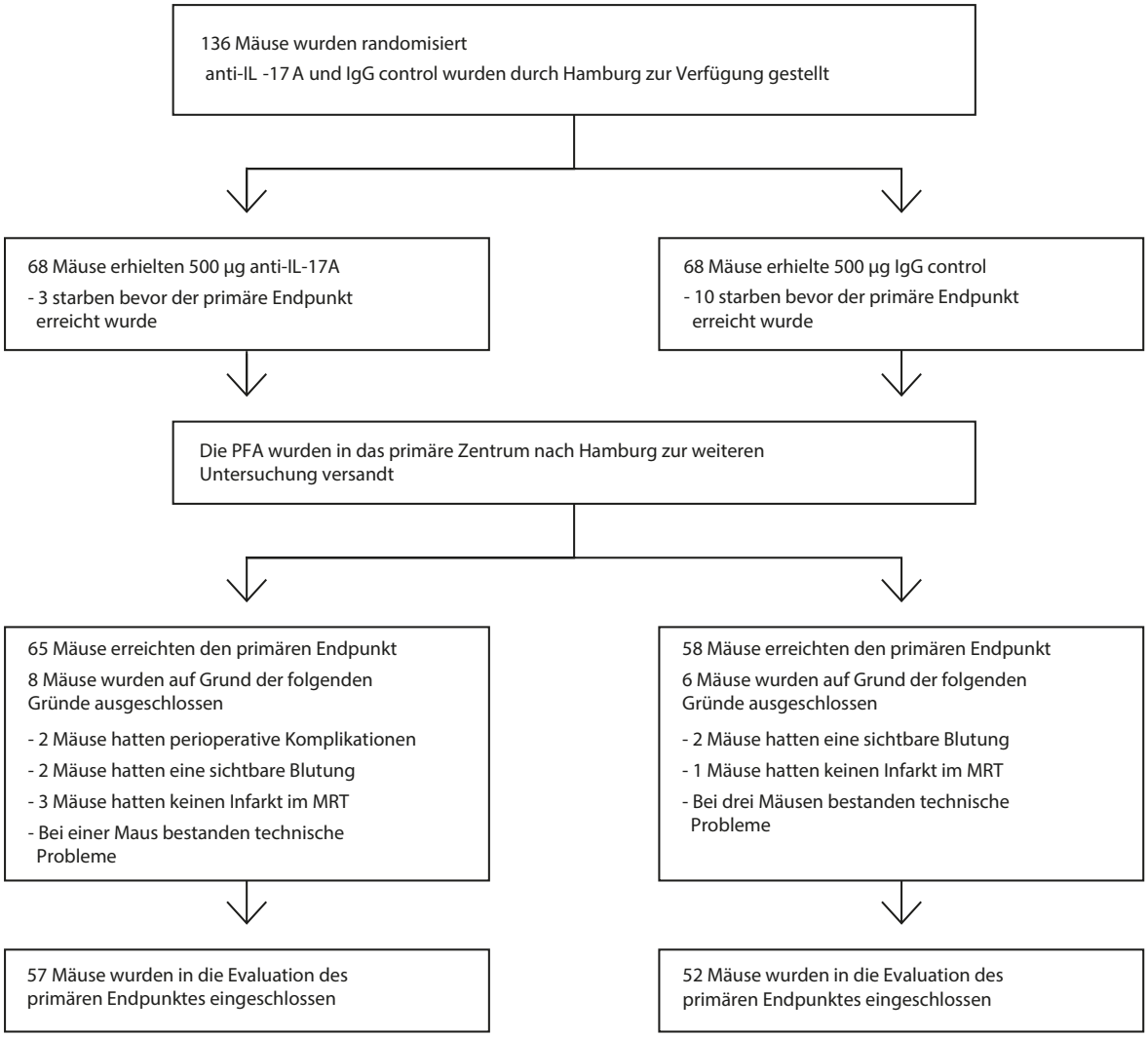

Abbildung 4: Einschluss- und Ausschluss einzelner Tiere auf Grund von Mortalität sowie Prä-Analytischen und analytischen Kriterien.

4.3 Primäre Outcome Variable

Als primärer Endpunkt wurden die Infarktgrößen nach Ödemkorrektur an Tag drei nach tMCAO gewählt, eine in Nagetierstudien bereits seit vielen Jahren verwandte und bewährte Variable (Vgl. Bsp. Gelderblom et al. 2012, Llovera et al. 2015). Die Infarktvolumina wurde von zwei unabhängigen und verblindeten Untersuchern bestimmt.

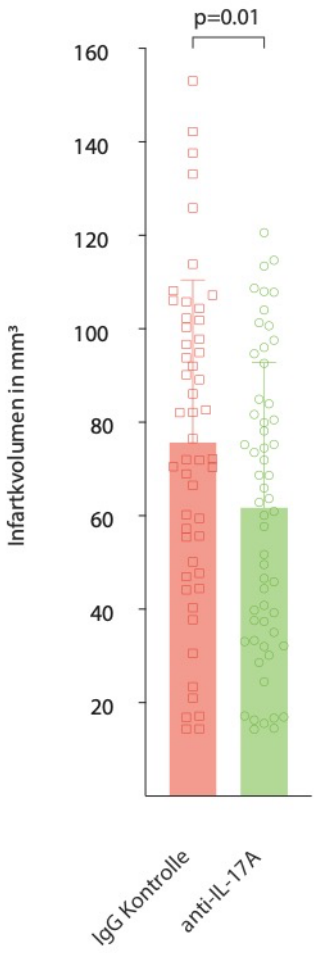

Abbildung 5: Infarktvolumina in mm³ der gesamten Kohorte Infarkten für Kontroll- und Treatment Gruppe. Jeder Punkt steht für einen Messwert, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. Mixed-Model Analyse, $F_{(1,209)}=6,56$, $p<0,01$, $n=109$.

Die mittlere Infarktgröße und Standardabweichung in der anti-IL-17A Gruppe lag bei 61,77 ± 31,04 mm³, in der Kontrollgruppe bei 75,66 ± 34,79 mm³ (*Abbildung 5*). Die Range in der Treatment-Gruppe lag bei 106,2, in der Kontroll-Gruppe bei 138,7. Die statistische Analyse, die mit Hilfe eines Mixed-Model Modells die Bewertung der Werte beider Rater ermöglichte, ergab eine signifikante Teststatistik für das Treatment (anti-IL-17A vs. IgG1-Control) von $F_{(1,209)}=6,56$, $p<0,01$, $n=109$.

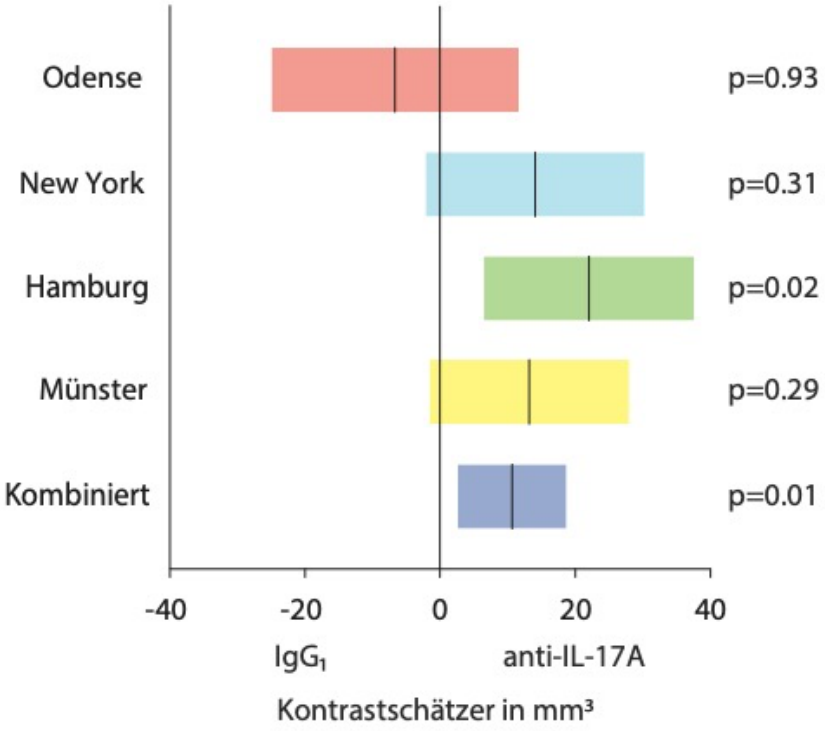

Abbildung 6: Geschätzter Unterschied in mm³, individuell für jedes einzelne Zentrum berechnet. Werte auf der linken Seite sind unter dem Kontrolltreatment kleiner, solche auf der rechten Seite unter dem Verum. Gezeigt ist der Kontrastschätzer der gesamten Kohorte. Mixed-Model Analyse: Hamburg: ($F_{(1,209)}$=7,76, p=0,02, n=29), Münster: ($F_{(1,209)}$=2,88, p=0,29, n=32), New York: ($F_{(1,209)}$=3,04, p=0,31, n=27), Odense: ($F_{(1,209)}$=0,51, p=0,93, n=21).

Zur weiteren Einschätzung der Wirksamkeit in den einzelnen Zentren berechneten wir zusätzlich die erwarteten Effekte für jedes Studienzentrum separat (*Abbildung 6*). Hier zeigte sich nach Alpha-Fehler Adjustierung für die Hamburger Kohorte ein signifikanter Effekt ($F_{(1,209)}$=7,76, p=0,02, n=29) sowie für die Kohorten aus Münster ($F_{(1,209)}$=2,88, p=0,29, n=32) und New York ($F_{(1,209)}$=3,04, p=0,31, n=27) ein Trend zu Gunsten der anti-IL-17A Behandlung. Lediglich in Odense ($F_{(1,209)}$=0,51, p=0,93, n=21) ließ sich dieser Trend nicht abbilden. Ferner haben wir mittels einer Regressionsanalyse die Korrelation der Werte beider Rater berechnet und konnten einen signifikanten Zusammenhang zeigen (Pearson r=0,87, CI = 0,82 – 0,91, p<0,001, n=109, *Abbildung 7*). Im Anschluss an die MRT Auswertung erfolgte an 12 Stichproben unterschiedlicher Infarktgröße eine histologische Infarktvolumenbestimmung. Hier zeigte sich trotz durchweg kleinerer Infarktvolumina in einer Regressionsanalyse ein hoch signifikanter Zusammenhang der Daten (Pearson r=0,96, CI = 0,86 – 0,99, p<0,0001, n=12, *Abbildung 8*).

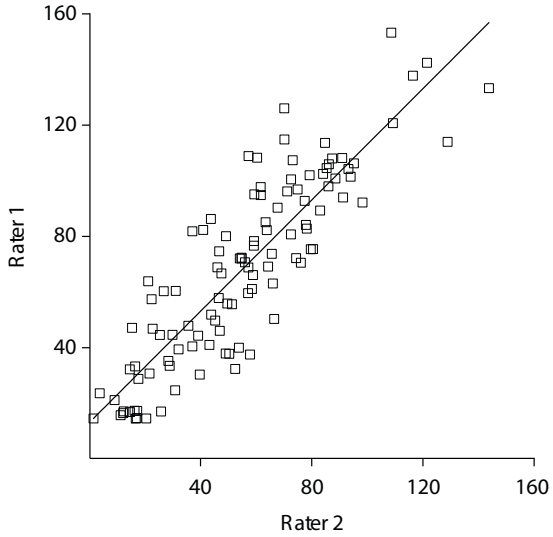

Abbildung 7: Gezeigt sind die jeweils komplementären Paare der Infarktvolumetrie beider Rater. Pearson r=0,87, CI = 0,82 – 0,91, p<0,001, n=109.

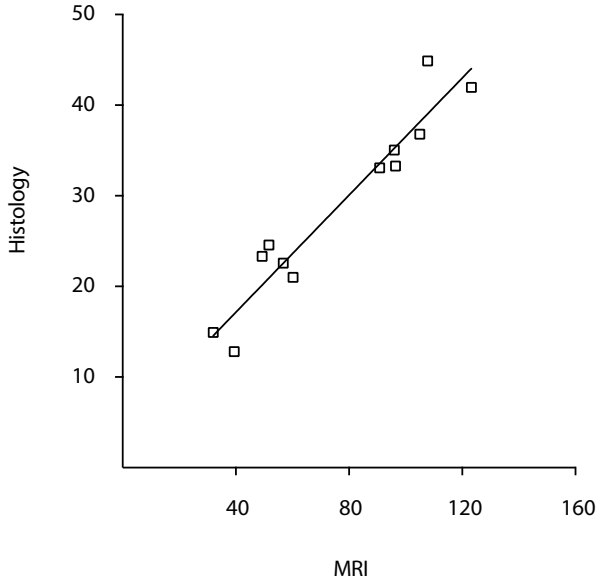

Abbildung 8: Gezeigt sind die jeweils komplementären Paare ADC- und Histologie basierter Infarktvolumetrie. Pearson r=0,96, CI = 0,86 – 0,99, p<0,0001, n=12.

Wir konnten damit zeigen, dass das Treatment zu einem signifikanten Unterschied der Infarktvolumina an Tag drei führte mit kleineren Infarkten in der mit anti-IL-17A behandelten Gruppe. Die ADC gestützte Untersuchung konnte die Infarkte ferner sowohl reliabel als auch valide darstellen.

Auffällig waren einige, deutlich kleinere Infarkte in beiden Treatment-Gruppen. Nach visueller Überprüfung der Rohdaten durch zwei unabhängige Wissenschaftler

zeigten sich die kleinen Infarkte zum allergrößten Teil subkortikal gelegen. Wir teilten die Daten auf Grund dieser Beobachtung in zwei weitere Gruppen – Tiere mit striatalem und kortikalem (globalem) Infarkt und solche mit rein striatalem Infarkt.

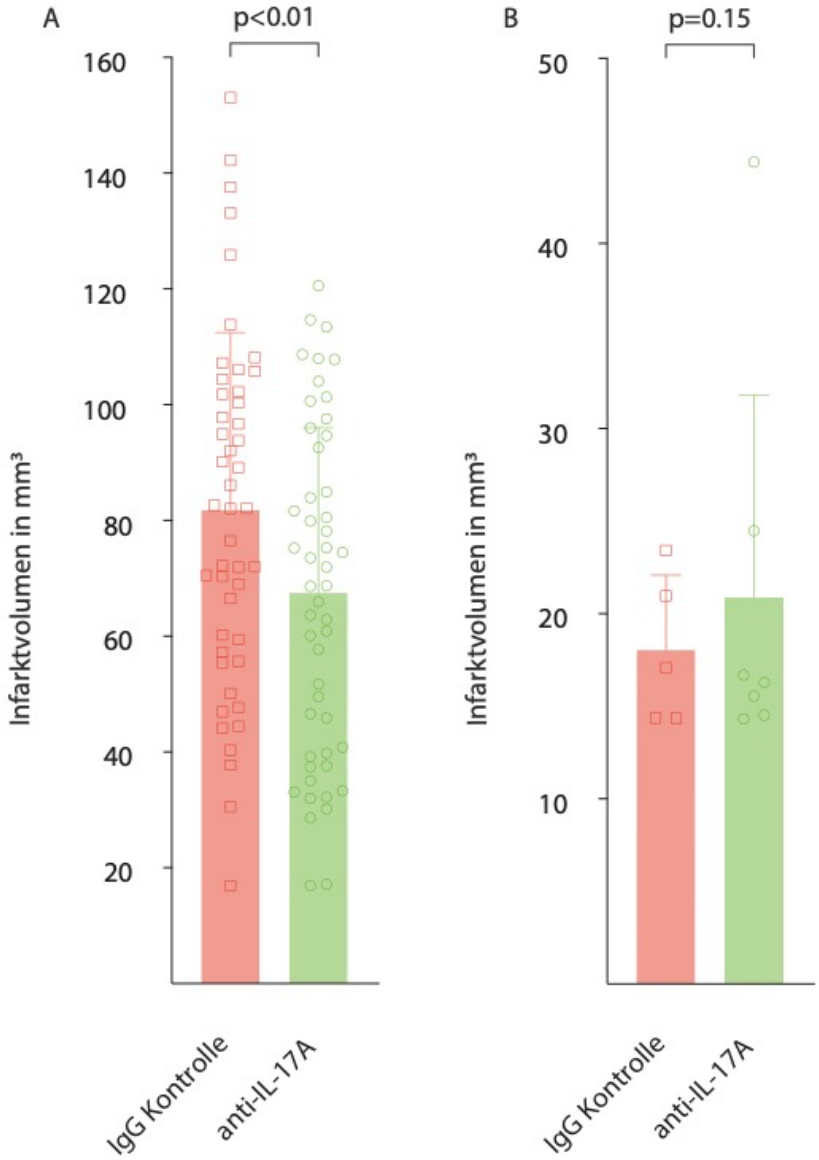

Abbildung 9: A: Infarktvolumina in mm³ der Kohorte mit globalen Infarkten für Kontroll- und Treatment Gruppe. B: Infarktvolumina in mm³ der Kohorte mit rein striatalen Infarkten für Kontroll- und Treatment Gruppe. Jeder Punkt steht für einen Messwert, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. Mixed-Model Analyse; A: $F_{(1,185)}=8,91$, $p<0,01$, $n=97$; B: $F_{(1,16)}=2,26$, $p=0,15$, $n=12$.

In der Gruppe der globalen Infarkte verblieben hierdurch noch 97 Tiere, 50 von diesen in der anti-IL-17A und 47 in der Kontrollbedingung. Der Mittelwert der anti-IL-17a Treatment Kohorte lag bei 67,49 ± 28,54 mm³, der Kontrollgruppe bei 81,8 ± 30,67 mm³. In der Gruppe der rein striatalen Infarkte waren insgesamt zwölf Tiere zu finden, hiervon waren sieben in der Treatment- und fünf in der Kontrollgruppe.

Die Mittelwerte lagen hier bei 20,89 ± 10,93 mm^3 beziehungsweise 18,03 ± 4,05 mm^3 (*Abbildung 9*). In der statistischen Auswertung der Daten ergab sich eine Teststatistik von $F(_{1,185})$=8,91, p<0,01, n=97 in der Gruppe der globalen Infarkte und $F(_{1,16})$=2,26, p=0,15, n=12 in der Gruppe der rein striatalen Infarkte.

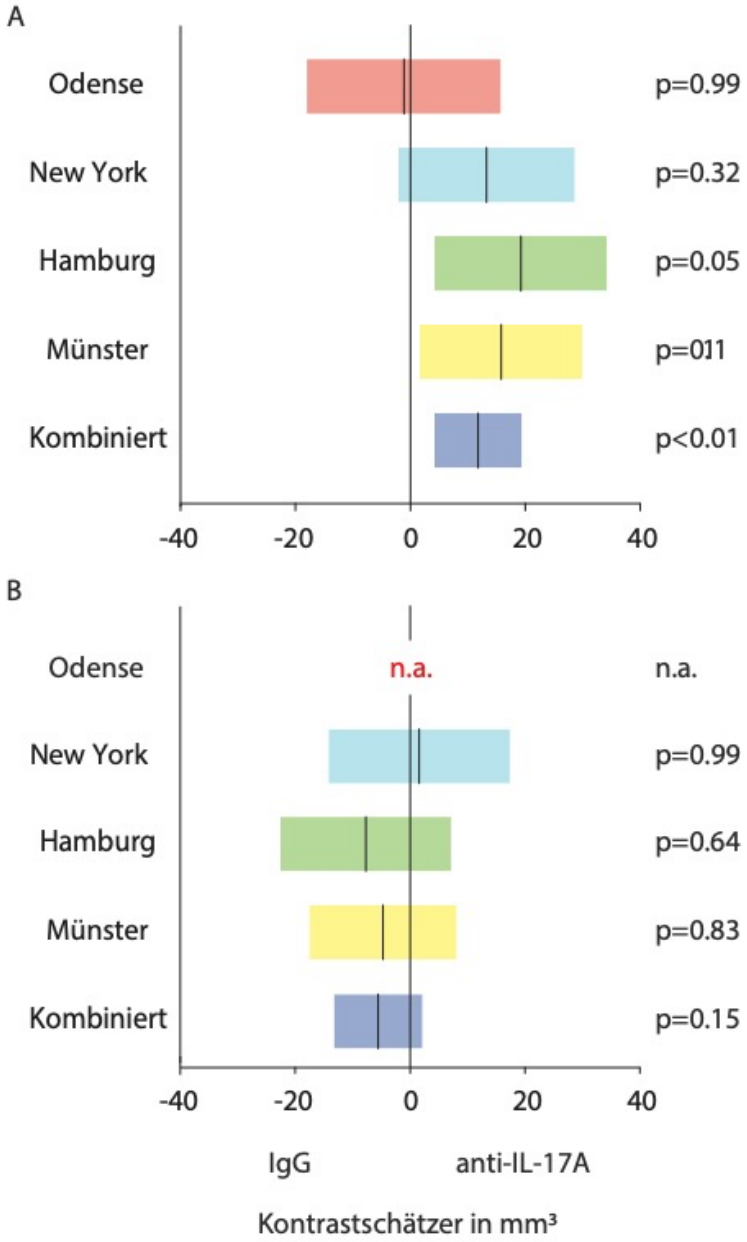

Abbildung 10: Geschätzter Unterschied in mm^3, individuell für jedes einzelne Zentrum berechnet. Werte auf der linken Seite sind unter dem Kontrolltreatment kleiner, solche auf der rechten Seite unter dem Verum. A: Kontrastschätzer in der Kohorte der globalen Infarkte. Mixed-Model Analyse; Odense: $F(_{1,185})$=0,18, p=0,99, n=20; New York: $F(_{1,185})$=2,82, p=0,32, n=24; Hamburg: $F(_{1,185})$=6,23, p=0,05, n=25; Münster: $F(_{1,185})$=4,71, p=0,11, n=28; B: Kontrastschätzer in der Kohorte der rein striatalen Infarkte. New York: $F(_{1,16})$=0,041, p=0,99, n=3; Hamburg: $F(_{1,16})$=1,19, p=0,64; n=4; Münster: $F(_{1,16})$=0,59 , p=0,83, n=4; Odense: nicht auswertbar

In einer weiteren Analyse der Einzelzentren ergab sich in der Gruppe der globalen Infarkte das gleiche Bild wie in der Gesamtanalyse (Odense: $F(_{1,185})$=0,18, p=0,99,

n=20; New York: $F(_{1,185})=2,82$, p=0,32, n=24; Hamburg: $F(_{1,185})=6,23$, p=0,05, n=25; Münster: $F(_{1,185})=4,71$, p=0,11, n=28, *Abbildung 10*A), in der rein-striatalen Gruppe konnte kein Trend in einem der Zentren nachgewiesen werden. Für Odense konnte jedoch keine Einzelzentrumsanalyse vorgenommen werden, da rein striatale Infarkte nicht für beide Gruppen zur Verfügung standen (New York: $F(_{1,16})=0,041$, p=0,99, n=3; Hamburg: $F(_{1,16})=1,19$, p=0,64; n=4; Münster: $F(_{1,16})=0,59$, p=0,83, n=4, *Abbildung 10B)*

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das anti-IL-17A-Treatment einen hoch signifikanten Effekt auf die Reduktion der Infarktvolumina drei Tage nach Schlaganfallinduktion hatte. Subgruppenanalysen ergaben, dass bei Tieren mit rein striatalen Infarkten ohne kortikale Beteiligung dieser Behandlungseffekt nicht nachgewiesen werden konnte.

4.4 Sekundäre Outcome Variablen

Die sekundären Outcome-Parameter umfassten die Mortalität bis zum dritten Tag, den Bederson-Neuroscore und die Anzahl der infiltrierenden Neutrophilen Granulozyten in die ischämischen Areale.

In der anti-IL-17A Treatment Gruppe verstarben vor Beendigung der Studie insgesamt drei Tiere, wobei sämtliche dieser Gruppe zugehörigen Tiere in Odense zu finden waren. In der Kontrollgruppe verstarben insgesamt zehn Tiere, fünf in Odense, drei in New York und je eins in Münster sowie in Hamburg. Betrachtet man den Tod der Tiere in Abhängigkeit der Tage, so verstarben an Tag eins in der anti-IL-17A Gruppe zwei Tiere, in der Kontrollgruppe sechs. An Tag zwei waren es eins beziehungsweise drei Tiere in den jeweiligen Gruppen. Bis zum dritten Tag verstarb kein weiteres in der Treatment- und ein weiteres in der Kontrollgruppe. Wir führten eine Mortalitätsanalyse durch, in der sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen aufzeigte ($\chi^2(_1)=4,15$, p=0,04, n=122). Das Hazard-Ratio der beiden Treatments betrug 3,43 bei einem 95% KI von 1,157 – 10,18. Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass das anti-IL-17A Treatment mit einer signifikant erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit bis zum dritten Tag einherging (*Abbildung 11A, B*).

A

Anzahl toter Tiere pro Zentrum		
Zentrum	anti-IL-17A	IgG control
Odense	3	5
New York	0	3
Hamburg	0	1
Münster	0	1
Gesamtanzahl	3	10

B

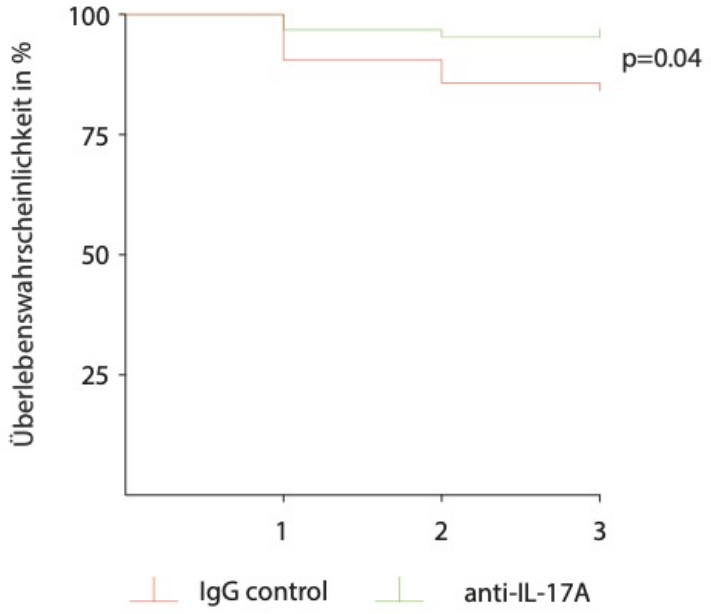

Abbildung 11: A: Tabellarische Auflistung aller verstorbenen Tiere, aufgeteilt nach Zentren und Treatment. B: Kaplan-Meier Plot über drei Tage, aufgeteilt nach den jeweiligen Treatments, Log-Rank Test: $\chi^2(_1)=4,15$, p=0,04, n=122.

Im nächsten Schritt betrachteten wir die Unterschiede im Bederson-Neuroscore, welcher ein einfach durchzuführender Test in der Aufdeckung motorischer Unterschiede nach Schlaganfall in Nagetieren ist. Der Score wurde jeweils am Tag der OP und an den postoperativen Tagen eins und drei erhoben. Postoperativ lag der Mittelwert in der Treatment Gruppe bei 2,03 ± 0,97 und 1,97 ± 1,04 in der Kontroll-Kohorte. An Tag eins lagen die Mittelwerte bei 1,64 ± 1,03 und 1,76 ± 1,07 und an Tag drei bei 1,30 ± 1,06 respektive 1,52 ± 1,06.

Statistisch zeigte sich weder am Tag der OP, noch am ersten oder dritten postoperativen Tag ein signifikanter Unterschied (Drei Stunden: U=1878, p=0,82, Tag eins: U=1417, p=0,48, Tag drei: U=1341, p=0.25, *Abbildung 12*).

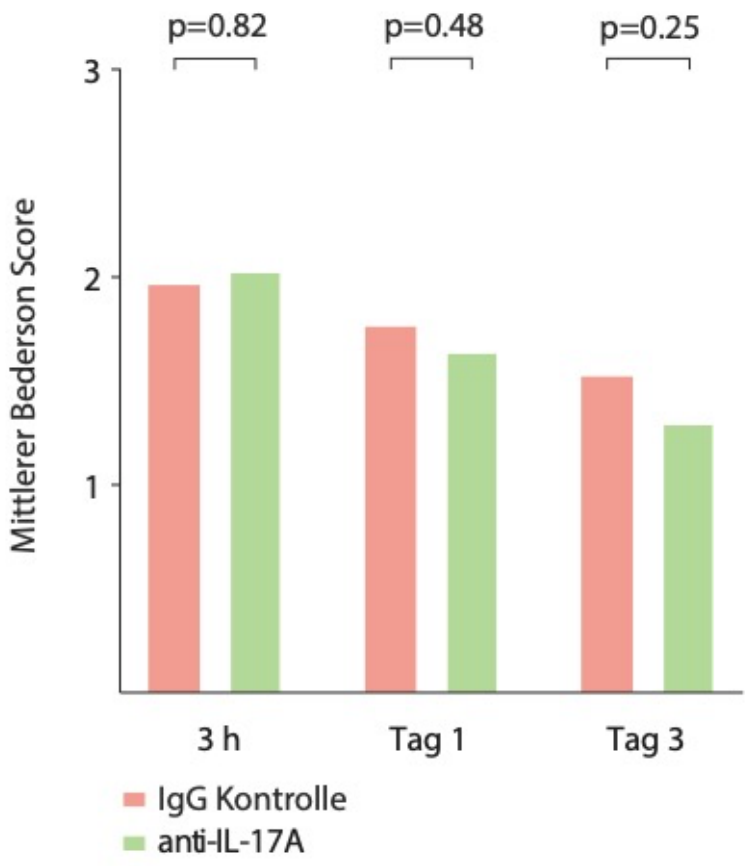

Abbildung 12: Mittlerer Bederson-Score für die jeweiligen Gruppen über drei Tage. Mann-Whitney-Test: 3 h: U=1878, p=0,82, Tag 1: U=1417, p=0,48, Tag 3: U=1341, p=0.25

Wir betrachteten ferner den Gewichtsverlust der Tiere über den Zeitraum der Studie. Das Gewicht wurde präoperativ und an allen Folgetagen überprüft. Sowohl in der Treatment- als auch der Kontrollgruppe zeigte sich ein Gewichtsverlust über die drei Tage. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen unterschieden sich weder präoperativ (Anti-IL-17A 26,88 ± 2,90, IgG-Kontrolle 27,29 ± 2,61), noch am ersten (24,45 ± 2,40 vs. 24,98 ± 2,52) oder dritten postoperativen Tag (23,29 ± 3,05 vs. 23,19 ± 2,80). In einer statistischen Analyse zeigte sich zwar ein global signifikanter Verlust des Körpergewichts über die Zeit, welcher sich jedoch nicht zwischen den einzelnen Gruppen unterschied (PreMCAO: $t(_{125,4})$=0,84, p=0,78, n=128; Tag 1: $t(_{109,4})$=1,14, p=0,59, n=114; Tag 3: $t(_{106,3})$=0,17, p=0,99, n=109, *Abbildung 13*).

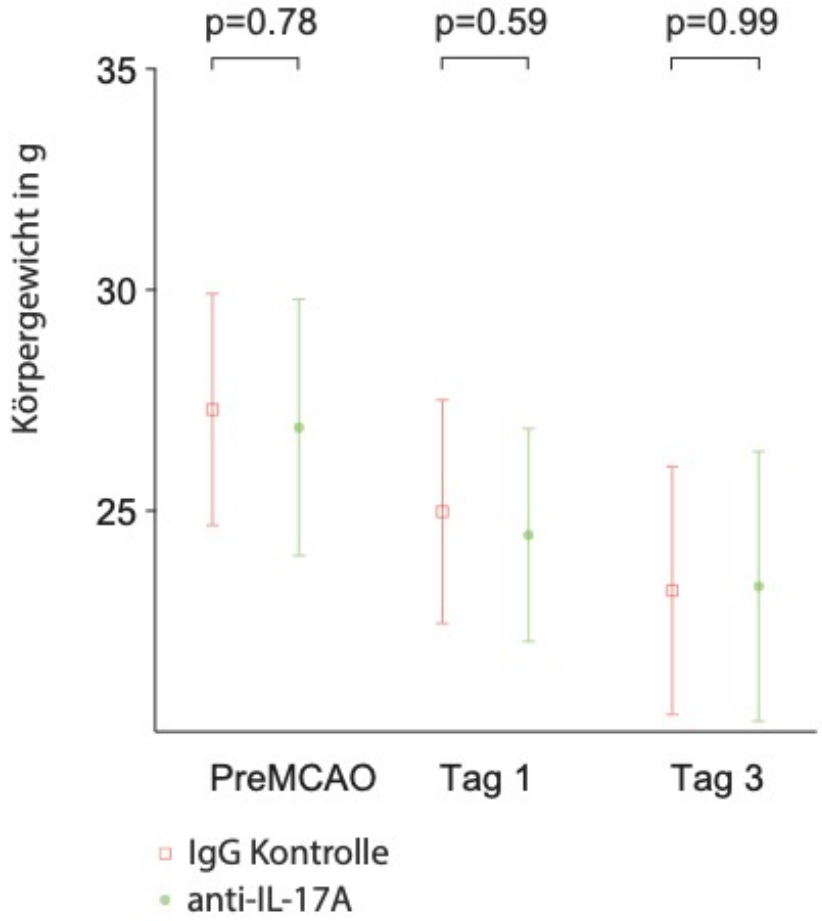

Abbildung 13: Gewichtsverlust innerhalb der jeweiligen Gruppen über drei Tage. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Mixed-Model Analyse: PreMCAO: $t_{(125,4)}=0,84$, $p=0,78$, $n=128$; Tag 1: $t_{(109,4)}=1,14$, $p=0,59$, $n=114$; Tag 3: $t_{(106,3)}=0,17$, $p=0,99$, $n=109$.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass für die Tiere der anti-IL-17A Treatment Gruppe eine signifikant geringere Wahrscheinlichkeit bestand, bis zum dritten postoperativen Tag an einem Schlaganfall zu sterben. Signifikante Unterschiede in den Verhaltenstests waren nicht zu finden.

4.5 Infiltration Neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten haben einen wesentlichen Effekt auf die sekundäre Schädigung des Gehirns. Ihre Infiltration in das ischämische Gehirn wird indirekt über die IL-17A vermittelte, indem IL-17A die Expression von CXCL-1 in Astrozyten induziert (Gelderblom et al. 2012, Shichita et al. 2009). Wir haben in der Histologie der aufbereiteten Gehirne die Menge infiltrierender Neutrophiler Granulozyten bestimmt. Ferner haben wir diese nach kortikaler und subkortikaler Infiltration

aufgeteilt, da bekannt ist, dass die Hauptmenge IL-17A produzierender γδ T Zellen in den Meningen zu finden sind (Ribeiro et al. 2020).
Insgesamt wurden acht Gehirne ausgezählt, wobei nur Hirne mit globalen Infarkten berücksichtigt wurden. Auf Grund von Präparationsartekfakten konnten die Proben aus Münster nicht berücksichtigt werden.

In der anti-IL-17A Treatment Gruppe zeigten sich im Kortex 3025 ± 1954 und im Striatum 2530 ± 2433, in der Kontrollgruppe waren im Kortex 15400 ± 6396 und im Striatum 3145 ± 1230 Zellen zu finden. In der statistischen Auswertung dieser Daten zeigte sich ein hochsignifikanter Effekt für das Treatment im Kortex, jedoch nicht im Striatum (Cortex: $t_{(12)}=4{,}85$, $p<0.01$, Striatum: $t_{(12)}=0{,}24$, $p=0{,}97$, $n=8$, *Abbildung 14A, B*).

Es konnte somit in der histologischen Aufarbeitung gezeigt werden, dass Neutrophile Granulozyten primär in kortikale Bereiche infiltrieren und, dass die Anzahl von Neutrophilen Granulozyten nach Behandlung mit IL-17A Antikörpern signifikant vermindert ist.

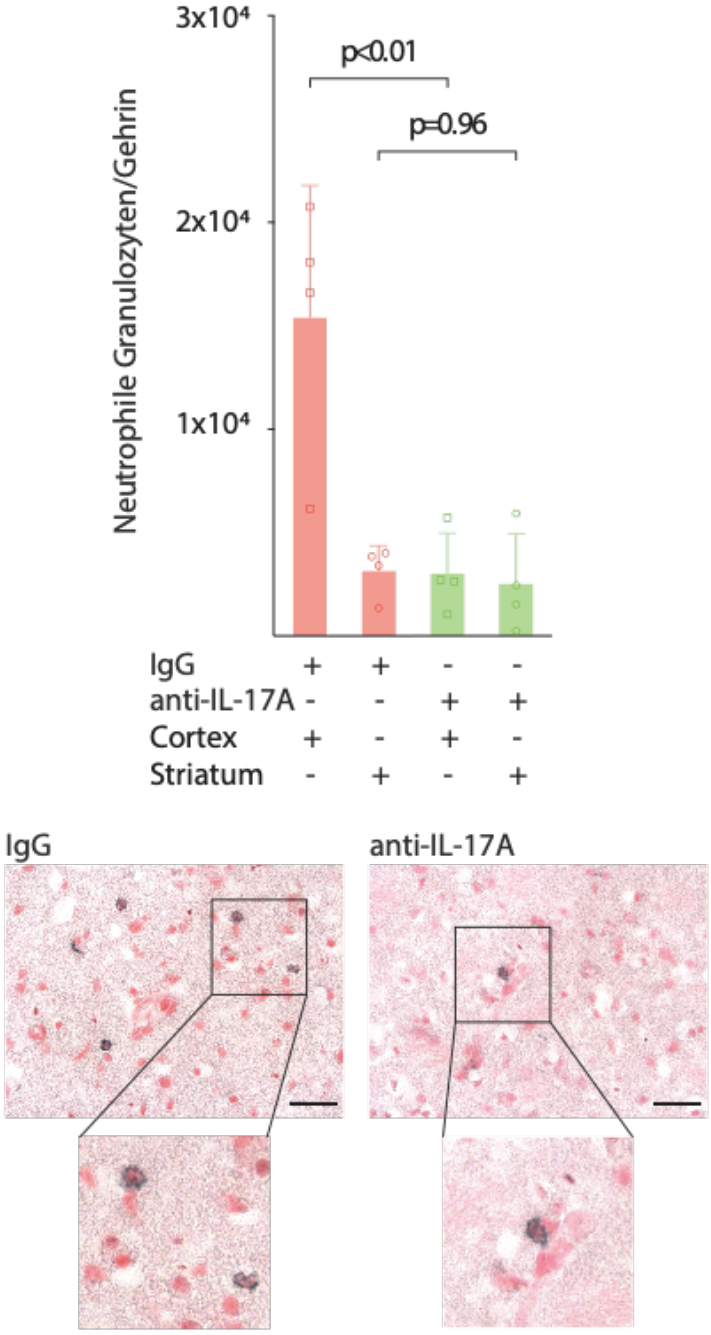

Abbildung 14: A: Gezeigt sind die geschätzten Absolut Werte der infiltrierenden Neutrophilen Granulozyten in das Infarktgebiet in Abhängigkeit vom anatomischen Kompartiment und einer Behandlung mit Kontroll-Antikörper oder anti-IL-17A Antikörper. Multivariate Varianzanylse: Cortex: $t_{(12)}=4{,}85$, $p<0.01$, Striatum: $t_{(12)}=0{,}24$, $p=0{,}97$, $n=8$. B: Gezeigt sind Beispielbilder aus den Kortizes einzelner Tiere sowohl unter der Kontroll- als auch der Treatment Bedingung. Der Referenzbalken entspricht 10 µm.

4.6 Zusammenfassung der erhobenen Daten

Wir konnten mit dieser präklinischen, randomisierten und Placebo-kontrollierten Studie zeigen, dass die Therapie mittels eines anti-IL-17A Antikörpers im therapeutischen Zeitfenster im Schlaganfallmodell der Maus zu einer signifikanten Reduktion des Infarktvolumens führt. Subgruppenanalysen der primären Outcome Variable ergaben, dass Tiere mit rein striatalen Infarkten keinen signifikanten Unterschied in der Bestimmung Infarktgrößenbestimmung zeigten und somit nicht von der Behandlung profitieren. Tiere mit Infarzierung sowohl des Kortex als auch des Striatums profitierten in dieser Analyse am stärksten von der Behandlung. In einer weiteren Aufschlüsselung der Daten der jeweiligen Einzelzentren zeigte sich ein Trend in Richtung kleinerer Infarkte in drei von vier Zentren, lediglich in Odense war dieser Trend nicht vorhanden.

In der Analyse der sekundären Outcome Parameter konnten wir zeigen, dass die Behandlung mittels anti-IL-17A Antikörper mit einer signifikant erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit innerhalb der ersten drei Tage einhergeht. Zudem infiltrierten signifikant weniger Neutrophile Granulozyten in der anti-IL17A behandelten Gruppe in das Schlaganfallgebiet.
Die motorischen Fähigkeiten im Bederson-Neuroscore und der Gewichtsverlust wurden über die Studiendauer von drei Tagen dahingegen nicht durch die anti-IL-17A Behandlung beeinflusst.

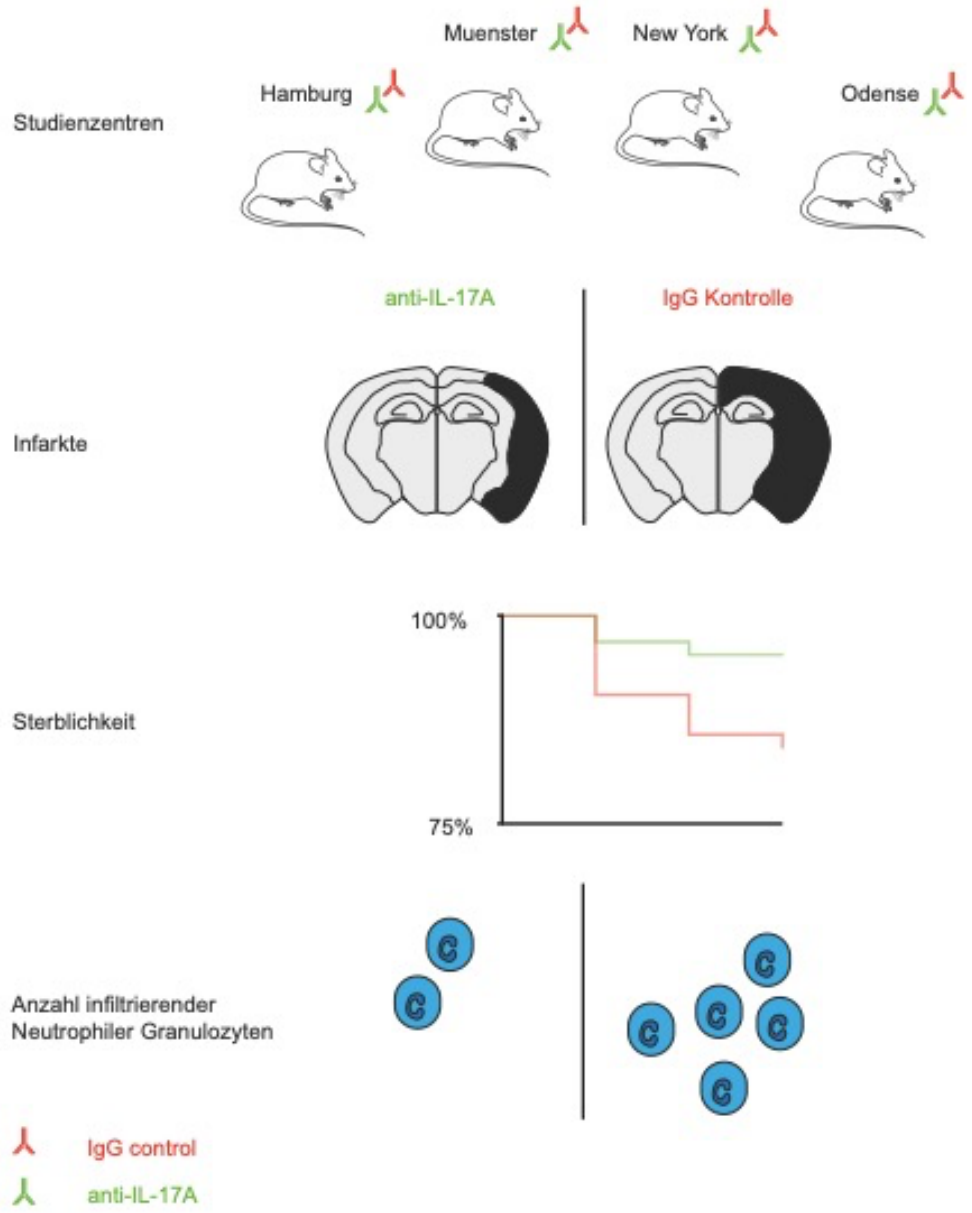

Abbildung 15: Graphische Übersicht der Effekte des anti- IL-17A Treatments im Schlaganfallmodell der Maus. Es zeigten sich geringere Infarktgrößen, eine verminderte Sterblichkeit bis zum dritten Tag und eine verminderte Menge infiltrierender Neutrophiler Granulozyten in das ischämische Gebiet.

5 Diskussion

5.1 Die Inhibition von IL-17A wirkt protektiv im Mausmodell des Schlaganfalls

Wir konnten mittels dieser präklinischen, multizentrischen, randomisierten, kontrollierten Studie die bisherigen monozentrischen Ergebnisse zur Inhibition von IL-17A im Schlaganfall bestätigen und um wesentliche neue Erkenntnisse ergänzen. Wir konnten zeigen, dass die Inhibition von IL-17A mittels neutralisierender Antikörper in vier weltweit verteilt lokalisierten, unabhängigen Laboren zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgrößen und der Mortalitätsrate im transienten Schlaganfallmodell der Maus führte.

Interleukin-17A besitzt durch seine Pleiotropie multiple Funktionen innerhalb des Immunsystems. Es fungiert bei inflammatorischen Prozessen als ubiquitärer Aktivator des Entzündungsprozesses und kann das Ausmaß der Inflammation massiv beeinflussen (Veldhoen 2017). Diese Eigenschaften machen IL-17A zu einem wirksamen Ziel in der Therapie von Erkrankungen mit überschießender oder unkontrollierter inflammatorischer Aktivität (Liu et al. 2020). Monozentrische Studien haben sich in der Vergangenheit mit der Rolle von IL-17A in der Entzündungsreaktion bei der zerebralen Ischämie beschäftigt. Es konnte gezeigt werden, dass IL-17A einen wesentlichen Anteil an der überschießenden Immunreaktion hat und dass die Inhibition von IL-17A u.a. die Infarktgrößen der untersuchten Mäuse signifikant reduzieren konnte (Shichita et al. 2009, Gelderblom et al. 2012).

Bei der Betrachtung von Lymphozyten wird IL-17A im Wesentlichen durch zwei verschiedene Zelltypen produziert, $CD4^+$ Th-17 Zellen und γδ T Zellen. Letztere sind in der Maus auch unter homöostatischen Bedingungen in den Meningen lokalisiert. Auch wenn ihre physiologische Rolle noch nicht vollends verstanden ist, konnten bisherige Untersuchungen eine wesentliche Beteiligung an der Leistungsfähigkeit des Kurzzeitgedächtnisses und dem angstassoziierten Verhalten der Tiere feststellen (Ribeiro et al. 2019, Alves de Lima et al. 2020). Unter pathophysiologischen Bedingungen wie im ischämischen Schlaganfall nehmen die IL-17A produzierenden γδ T Zellen jedoch eine schädigende Rolle ein (Gelderblom et al. 2016). Durch die vermehrte Ausschüttung von IL-17A erfolgt im

Zusammenspiel mit TNF-α eine Aktivierung von Zellen des Binde- und Stützgewebes, beispielsweise in Astrozyten. Die hieraus folgende vermehrte Produktion von CXCL-1 führt zu einer Infiltration Neutrophiler Granulozyten in das ischämische Gewebe nach Schlaganfall (Gelderblom et al. 2016).

Die Inhibition von IL-17A führte zu einer verminderten Infiltration Neutrophiler Granulozyten in das Schlaganfallgebiet. Auffällig war eine vermehrte Ansammlung Neutrophiler Granulozyten in kortikalen Gebieten. Diese verstärkte kortikale Infiltration zeigte sich unabhängig der gewählten Behandlung der Tiere in dieser Studie. Die Infarktgrößen rein striataler Infarkte ließen sich nicht signifikant durch die Behandlung mittels anti-IL-17A Antikörpern beeinflussen, Infarkte mit kortikaler Beteiligung konnten jedoch signifikant reduziert werden. Unter der Betrachtung bisheriger Studien hinsichtlich der Beeinflussung der granulozytären Infiltration durch IL-17A und den hier gewonnen Erkenntnissen zur Lokalisation der Infiltration kann hypothetisiert werden, dass IL-17A eine Mediator-Funktion in der Entwicklung der postischämischen Infarktvolumina hat (Gelderblom et al. 2016, Griffin et al. 2012). Die Reduktion der Infarktgrößen dient daher als ein primär erwünschtes jedoch indirektes Maß der Effektivität der IL-17A Behandlung.

In Anbetracht der engen räumlichen Beziehung zwischen Kortex und Meningen, den physiologisch vorhandenen meningealen γδ T Zellen und der vermehrten IL-17A Produktion dieser Zellen unter ischämischen Bedingungen kann von einer relevanten Beteiligung dieser meningealen γδ T Zellen an der postischämischen Entzündungsreaktion mit verstärkter granulozytärer Infiltration ausgegangen werden. Diese Annahme wird durch die Daten dieser Studie mit Abnahme der Infarktvolumina und verminderter granulozytärer Infiltration nach anti-IL-17A Behandlung gestützt. Die vermehrte IL-17A Produktion kann daher als ein wesentlicher pathologischer Prozess der überschießenden, sterilen, post-ischämischen Inflammation gewertet werden wobei die eigentliche Gewebeschädigung nicht durch die γδ T Zellen selbst sondern durch u.a. Neutrophile Granulozyten erfolgt.

Wir können aus den vorliegenden Daten keine Aussage hinsichtlich der pathophysiologischen Funktion vornehmen, die IL-17A im Schlaganfall über die

Infiltration Neutrophilen Granulozyten hinaus hat. Frühere in vitro Studien konnten einen direkten Effekt von IL-17A auf Neurone in ischämischen Neuronen aufzeigen (Wang et al. 2009). Um diesen Effekt genauer zu analysieren sind weiterführende mechanistische Untersuchungen notwendig. Methodisch ließe sich diese Frage beispielsweise durch das Ausmaß der Schädigung in einem Tier ohne funktionsfähige Neutrophile Granulozyten untersuchen. Hierdurch könnten Effekte der IL-17A Suppression aufgezeigt werden, die über die Infiltration der Granulozyten hinausgehen. Untersuchungen an Tieren ohne funktionsfähige IL-17A-Rezeptoren auf den Neuronen könnten darüber hinaus direkte Effekte von IL-17A auf Neurone analysieren.

Eine relevante Frage besteht hinsichtlich des Anteils der IL-17A Produktion im ischämischen Schlaganfall aus den bereits unter physiologischen Bedingungen meningeal lokalisierten γδ T Zellen und dem Anteil der IL-17A Produktion durch aus dem peripheren Immunkompartiment infiltrierenden γδ T Zellen und Th-17 Zellen. Benakis et al. (2016) konnten nachweisen, dass γδ T Zellen im ischämischen Schlaganfall aus dem Darmepithel in die Meningen transmigrieren und hier an der IL-17A Produktion beteiligt sind. Bisher ist es leider jedoch nicht möglich, eine definitive Aussage des Beitrags lokaler- und infiltrierender Zellen an der gesamten IL-17A Produktion zu treffen. Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig, beispielsweise durch Suppression der Infiltration weiterer γδ T Zellen in das ischämische Areal oder durch Untersuchungen hinsichtlich der Aktivität der einwandernden γδ T Zellen.

Es ergeben sich aus pathophysiologischer Überlegung unterschiedliche Ansatzpunkte der therapeutischen Intervention zur Inhibition der Aktivität des IL-17A im klinischen Alltag. Die Inhibition der IL-17A Aktivität selbst, so wie in dieser Studie durchgeführt, die Hemmung der Produktion des IL-17A oder die Unterdrückung der Migration von IL-17A^{+} Immunzellen in das ischämische Areal sind verschiedene therapeutische Anknüpfungspunkte. Im klinischen Alltag konnten bereits erfolgreich Antikörper gegen verschiedene Abschnitte des IL-17A Signalwegs etabliert werden (Liu et al. 2020). In der von uns durchgeführten präklinischen Multicenterstudie wurde erfolgreich ein Antikörper gegen IL-17A eingesetzt. Ob dies auch der effektivste und nebenwirkungsärmste Weg der

Suppression der IL-17A Kaskade ist, ist derzeit jedoch noch nicht abschließend beurteilbar und es bedarf weiterer Untersuchungen. Hier kann hinsichtlich des Nebenwirkungsprofils beispielsweise auch auf Daten der Suppression der IL-17A Achse aus anderen Krankheitsbildern zurückgegriffen werden (Liu et al. 2020, Gordon et al. 2016). Diesbezüglich müssen auch mögliche, in der Akutsituation auftretende Nebenwirkungen einer anti-IL-17A Therapie diskutiert werden. In Anbetracht der immunsuppressiven Funktion von anti-IL-17A Therapien kann es zu einer peripheren Neutropenie mit einer erhöhten Infektanfälligkeit kommen. So zeigte sich in einer Phase III Studie in der Behandlung einer Psoriasis mit Ixekizumab neben der Neutropenie eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für orale Candidosen (Gordon et al. 2016). Bei Patienten mit ischämischem Schlaganfall besteht in den ersten Tagen nach der Ischämie eine „post stroke immunodepression“. Diese bedingt eine erhöhte Infektanfälligkeit mit verstärkter Anfälligkeit für pulmonale- oder Harnwegsinfekte (Shi et al. 2018). In Anbetracht dieser erhöhten Infektanfälligkeit sollte den immunsuppressiven Nebenwirkungen der anti-IL-17A Therapie in jedem Fall Beachtung geschenkt und in der Entscheidung einer möglichen Therapieempfehlung berücksichtigt werden.

Bisher nicht genauer untersucht ist, welchen Langzeiteffekt eine erhöhte IL-17A Konzentration auf das Immunsystem und die Physiologie der Neurone und Gliazellen nach einer zerebralen Ischämie hat. Hier sind verschiedene Möglichkeiten der Beeinflussung denkbar. Zum einen kann eine chronische Inflammation, unterstützt durch eine prolongierte meningeale γδ T Zell-Reaktion, einen längerfristigen neuronalen Zelluntergang zur Folge haben. Ähnliche chronische inflammatorische Prozesse sind beispielsweise in neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer oder dem Morbus Parkinson nachgewiesen worden (Chen et al. 2020). Zum anderen ist es denkbar, dass eine verstärkte IL-17A Aktivität im ischämischen Schlaganfall für die neuronale Reorganisation und weitere physiologische Prozesse relevant ist, ähnlich der bekannten meningealen Funktion von IL-17A in gesunden Mäusen. Diesbezüglich ist die Frage nach der adäquaten Zeitdauer, Konzentration und Menge einer anti-IL-17A Antikörper-Therapie von wesentlicher Bedeutung. Sollte IL-17A einen über seine schädigende, pro-inflammatorische Rolle hinausgehenden Anteil, beispielsweise an der neuronalen Regeneration nach dem Schlaganfall haben, darf

die Gabe von IL-17A Antikörpern weder zu lange noch in einer zu hohen Dosis erfolgen. Es sind daher Untersuchungen hinsichtlich des Langzeiteffekts von IL-17A nach eingetretener zerebraler Ischämie notwendig.

Zusammenfassend konnten wir aufzeigen, dass mittels Neutralisierung von IL-17A die postischämische Entzündungsreaktion im ischämischen Schlaganfall positiv beeinflusst werden kann. Dieser aus monozentrischen Studien bekannte Effekt konnte in unseren Untersuchungen mittels Multicenter Design bestätigt werden. Es ist daher von einem starken Effekt mit ausreichender Robustheit gegenüber möglichen Störvariablen auszugehen. Von hoher Relevanz erscheint, dass nicht nur die primäre Variable des Infarktvolumens, sondern auch die Mortalität nach der Behandlung im Multicenter Design signifikant beeinflusst werden konnte. Mechanistisch zeigte sich in der Verum-Gruppe eine verminderte kortikale Infiltration Neutrophiler Granulozyten.

5.2 Die Wahl des korrekten Studiendesigns

Bisher publizierte humane Studien zur Immuntherapie des Schlaganfalls sind gänzlich gescheitert (Schmidt-Pogoda et al. 2020). Gemeinsam war nahezu all diesen humanen Untersuchungen, dass zuvor Daten muriner Studien vorlagen auf Basis derer die humanen Studien geplant wurden. Es ist daher zu diskutieren warum die bisherigen humanen Studien scheiterten, obwohl scheinbar ausreichende präklinische Daten zur Verfügung standen und wie in Zukunft die Studienplanung und -durchführung angepasst werden sollte, damit humane Untersuchungen zur Immunmodulation im ischämischen Schlaganfall erfolgreich gelingen. Die durchgeführte Studie soll als Beispiel einer methodisch präzise geplanten und ausgeführten präklinischen Multicenterstudie dienen.

Viele unterschiedliche Aspekte haben einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit eine klinische Studie erfolgreich durchzuführen. Hierzu zählen unter anderem die präzise Auswahl der therapeutischen Zielstruktur, einer adäquaten Zielvariable, einer hinreichend großen und klar definierten Stichprobe und einer korrekten Randomisierung, Verblindung und Wahl der Prüfstatistik (Stanley 2007).
Die Auswahl einer vielversprechenden therapeutischen Zielstruktur, beispielsweise einer interventionellen Maßnahme oder der Gabe eines Medikaments, erfolgt

anhand präklinisch in vitro und in vivo gewonnener Daten. Sind die Studien, mit denen diese präklinischen Daten erhoben wurden mit methodischen Mängeln behaftet, sinkt die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Translation in das humane System drastisch. So werden präklinische Untersuchungen häufig nur von einer kleinen Gruppe an Wissenschaftlern durchgeführt, Randomisierung und Verblindung von Daten erfolgen inkonsequent und die Effekte, die auf einzelne Faktoren zurück zu führen sind, werden unter anderem durch fehlende externe Validität überschätzt (Lourbopoulos et al. 2021). Durch das hier gewählte Studiendesign mit einer präklinischen Multicenterstudie können einige, jedoch nicht alle dieser Störvariablen beeinflusst werden. Hierdurch ist es uns gelungen, die Reliabilität und externe Validität der Daten zu verbessern und so die Wahrscheinlichkeit eine humane Studie erfolgreich durchzuführen deutlich zu erhöhen.

Ein wesentlicher Aspekt in unserer Arbeit lag in der konsequenten Verblindung und Randomisierung sowie der intensiven Studienplanung. Alle an den verschiedenen Arbeiten beteiligten Personen waren bis zur Ergebnisauswertung verblindet. Dies schloss sowohl die Operateure, die Untersucher der Mäuse während der Studie und die Tierpfleger als auch die Auswerter der primären- und sekundären Outcome Parameter mit ein. Die Antikörper wurden randomisiert und verblindet an die jeweiligen Zentren verschickt, hierdurch war es den verschiedenen beteiligten Personen zu keiner Zeit möglich, Rückschlüsse aus dem Verhalten oder dem klinischen Zustand der Tiere auf die jeweilige Behandlung zu ziehen. Durch vorab definierte Ausschlusskriterien war eindeutig festgelegt, welche Tiere aus der Studie zu nehmen waren. Entscheidungen anhand individueller Einschätzungen einzelner Personen konnten hierdurch vermieden werden. Es wurde somit ausgeschlossen, Daten im Nachhinein durch Vergrößerung der Stichprobe oder durch a posterio definierte Abbruch- und Ausschlusskriterien verändern zu können.

Ein weiterer wesentlicher Kritikpunkt an monozentrischen Studien liegt in der fehlenden a priori definierten Stichprobengröße (Dirnagl et al. 2013). Humane multizentrische Studien haben durch eine zuvor durchgeführte Poweranalyse eine Stichprobengrößenberechnung vorliegen, die zentral registriert wird. Hierdurch kann im Nachhinein detailliert sowohl eine Per-Protokoll als auch eine Intention-To-

Treat Analyse durchgeführt werden. Die Möglichkeit, die Ergebnisse durch Hinzu- oder Wegnahme nicht passender Teilergebnisse zu verändern, ist somit ausgeschlossen (Tripepi et al. 2020). Eine solche Stichprobenberechnung haben wir ebenfalls a priori für diese Studie durchgeführt, die von uns gewählte Analyse entsprach, gleich humanen Studien, einer Per-Protokoll Analyse.

Weiterhin problematisch an monozentrischen präklinischen Studien ist die fehlende externe Validität der Untersuchungen (Voelkl et al. 2018). Präklinische Forschung wird in Laboren mit minimalem Kontakt der Tiere zur Außenwelt durchgeführt. Die Untersuchungsbedingungen werden weitestgehend konstant gehalten. Hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit der Detektion kleinerer Effekte durch Kontrolle möglichst vieler Störvariablen erhöht, die Übertragbarkeit der Effekte auf andere Umgebungen nimmt jedoch deutlich ab. Diese Kritik trifft in gewissem Maße berechtigterweise auch auf präklinische Multicenterstudien zu. Dennoch kann durch die Einbeziehung unterschiedlicher Labore und Untersucher eine höhere externe Validität angenommen werden als dies in monozentrischen der Fall ist.

Insgesamt wurden die methodischen Mängel präklinischer Studien durch diese Untersuchung im Wesentlichen beseitigt. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die Untersuchungen dennoch weiterhin an einer hoch selektierten Stichprobe genetisch nahezu identischer Tiere in einem streng geschützten Umfeld stattfanden. Durch das Multicenterdesign lässt sich die externe Validität und die Reliabilität der Daten in jedem Falle erhöhen, eine Vergleichbarkeit zu humanen Multicenterstudien ist in vielen Punkten jedoch weiterhin nicht gegeben.

5.3 Die korrekte Interpretation der Studiendaten zur bestmöglichen Stichprobenselektion

Um die Translation der präklinischen Daten in den klinischen Alltag zu verbessern ist eine detaillierte Analyse der präklinischen Studiendaten von großer Bedeutung. Ein in den bisherigen Studien häufig missachteter Aspekt ist die Auswahl einer vielversprechenden Zielvariable durch Fehl- beziehungsweise Überinterpretation präklinischer Daten (Lourbopoulos et al. 2021).

Eine Zielvariable, die in murinen Schlaganfallstudien häufig Verwendung findet, ist der Unterschied der Infarktgrößen zwischen den zu untersuchenden Gruppen an einem vorab definierten Tag nach der Behandlung (Liu et al. 2009). Weitere regelhaft verwendete Zielparameter sind die Anzahl verschiedener infiltrierender Leukozyten in das ischämische Gehirn und die Menge oder Aktivität eines bestimmten Proteins in der ischämischen Hemisphäre, verglichen zur gesunden Seite (Grønberg et al. 2013). Ein wesentlicher Teil der humanen Schlaganfallstudien verwendet klinische Parameter als primäre Zielvariable. Im Akutstadium wird dies beispielsweise durch Unterschiede im NIHSS Score untersucht, langfristig durch Unterschiede in der mRS (Chalos et al. 2020).

Während in präklinischen Schlaganfallstudien durch die immer gleiche Operation an genetisch nahezu identischen Tieren in einer konstanten Umgebung durch einen einzelnen Operateur eine hohe Stabilität der Schlaganfallgrößen besteht, die in ihrer Variabilität insgesamt gering ist, sind ischämische Schlaganfälle beim Menschen in ihrer Ätiologie und ihrer Größe deutlich heterogener (Boehme et al. 2017). Durch das von uns gewählte Multicenterdesign kann diese Problematik teilweise behoben werden. Sowohl die Umgebung der Tiere in verschieden Tierställen als auch die Operateure und Tierpfleger unterschieden sich voneinander, was die externe Validität der Daten insgesamt im Vergleich zu monozentrischen Studien erhöht. Hierdurch kann ein zwar immer noch eingeschränktes, jedoch insgesamt realistischeres Bild der wahren Effekte geschaffen werden. Eine ähnliche Heterogenität hinsichtlich der Ätiologie der Schlaganfälle wie beim Menschen lässt sich jedoch auch durch das Multicenterdesign nicht adäquat abbilden.

Die Wahl der korrekten Zielvariable und Stichprobe erscheint vor dem Hintergrund der translationalen Probleme von großer Bedeutung. Aus den durch diese Studie generierten Daten können solche humanen Stichproben für eine Behandlung bestimmt werden, bei denen die Chance am höchsten ist, einen signifikanten Effekt der Behandlung zu finden. Die transiente Ischämie mit Reperfusionsschaden, die in unserer Multicenterstudie zur Schlaganfallinduktion verwendet wurde, führte zu großen, kortikal- und subkortikal kombinierten Ischämien. In der Praxis unterscheiden sich Patienten mit ischämischem Schlaganfall jedoch teils deutlich voneinander. Im Wesentlichen ist im Alltag zwischen kortikalen- und subkortikalen

und zwischen Ischämien mit und ohne Reperfusionsschaden zu unterscheiden (Panel et al. 1997). In den bisherigen Studien hinsichtlich der Wirksamkeit immunsuppressiver Medikamente im ischämischen Schlaganfall fand die Variabilität der Schlaganfallgrößen und deren unterschiedliche Ätiologie bei Einschluss der Patienten keine regelhafte Beachtung. Patienten wurden zumeist anhand ihrer klinischen Präsentation ausgewählt, eine Selektion auf Grund der Ätiologie fand in aller Regel nicht statt. Folgt man dem Studienprotokoll und den Ergebnissen der hier diskutierten Multicenterstudie, sollten jedoch zunächst nur Patienten für eine humane Untersuchung in Betracht kommen, die äquivalent zu den murinen, präklinischen Daten einen Großgefäßverschluss mit konsekutivem Reperfusionsschaden im vorderen Kreislauf erlitten haben. Hierfür würden sich demnach Patienten mit Verschluss einer der großen zerebralen Arterien wie der ACI, der ACM und der ACA eignen, die mithilfe eines arteriellen Katheters rekanalisiert werden. Eine therapeutische Möglichkeit bestünde in diesem Fall in der intraarteriellen, lokalen Injektion des IL-17A Antikörpers im Rahmen der Rekanalisation. Diese Form der Therapie hätte zum einen den Vorteil einer erhöhten lokalen Konzentration des Medikaments im Bereich der Ischämie, was zu einer verbesserten Suppression der lokalen IL-17A Aktivität führen würde. Zum anderen könnte die benötigte Menge an IL-17A Antikörper niedrig gehalten werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Nebenwirkungen wie einer erhöhten Infektanfälligkeit bei Neutropenie geringgehalten werden würde.

Wie dargestellt unterscheiden sich die gewählten Zielvariablen der murinen- und der humanen Studien teils deutlich voneinander. Diesbezüglich erscheint es sinnvoll, sowohl im präklinischen als auch im klinischen Umfeld eine Diskussion hinsichtlich der Wahl einer korrekten Variable zu führen. Eine Möglichkeit bestünde beispielsweise in der Wahl identischer bildgebender Zielparameter. Ein Design, welches von Zhu et al., 2015 in der Untersuchung der Effektivität von Fingolimod im ischämischen Schlaganfall gewählt wurde, ist die Zunahme der Infarktgröße über mehrere Tage hinweg. Dies ließe sich, ein Kleintier MRT vorausgesetzt, auch in murinen Studien komplikationslos umsetzen. Der größte Vorteil dieses Parameters liegt neben der Adaptation sowohl im präklinischen als auch im klinischen Umfeld in der Verwendung des relativen anstelle des absoluten Unterschieds der

Infarktgrößen. Sehr große oder kleine Infarkte fallen in diesem Fall weniger stark ins Gewicht.

Eine andere Möglichkeit der Angleichung der präklinsichen Studien an den klinischen Alltag bestünde in der Verbesserung und konsequenteren Verwendung muriner Verhaltenstests. In den hier erhobenen Daten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen auf Verhaltensebene beobachtet werden. Die von uns durchgeführten Tests waren einfache Verhaltenstests mit geringer Abgrenzung zwischen den einzelnen Abstufungen. Die Wahl weiterer Untersuchungsmethoden mit verbesserter Trennschärfe zwischen den jeweiligen Tieren und objektiveren Kriterien der Defizite der Tiere wäre aus unserer Perspektive nur konsequent und wünschenswert. Problematisch könnte dabei sein, dass diese aufwendigen Tests eines hohen Maßes an Expertise der Untersucher und eines hohen zeitlichen Aufwandes in der Anwendung bedürfen, was sie im Alltag impraktikabel erscheinen lassen.

Eine weitere Konsequenz, die in der Planung einer humanen Studie aus den in dieser Studie gewonnenen Daten entsteht ist die Wahl des therapeutischen Zeitfensters der Medikamentengabe. In der hier durchgeführten Studie wurden die Tiere mit einem zeitlichen Abstand von 60 Minuten nach dem Reperfusionsschaden mit einem der beiden Antikörper behandelt. Es kann dementsprechend lediglich geschlussfolgert werden, dass eine frühe Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgrößen und der Mortalität führt. Aussagen über ein erweitertes medikamentöses Zeitfenster können hieraus nicht getroffen werden. Dies muss in der Planung einer humanen Studie unbedingt durch ein vorgegebenes Zeitfenster der Therapie mit einbezogen werden. Andernfalls bestünde die Gefahr, kleine positive Effekte nicht zu detektieren.

Insgesamt ist somit festzuhalten, dass diese präklinische Multicenterstudie einen wesentlichen Beitrag in der Patientenselektion und der Wahl relevanter Outcome Parameter und dem adäquaten Untersuchungszeitpunkt leisten kann.

6 Zusammenfassung

Das Ziel der Studie war der Nachweis der Effektivität einer Behandlung mit anti-IL-17A Antikörpern in einer präklinischen, randomisierten und Placebo-kontrollierten Multicenterstudie. Die Grundlage für die Durchführung dieser Studie lag in den positiven monozentrischen Studiendaten zur Rolle von IL-17A im Schlaganfallmodell der Maus (Gelderblom et al. 2012, Shichita et al. 2009).

In der Studie konnten wir zeigen, dass die Behandlung mit einem neutralisierenden anti-IL-17A Antikörper auch in einem modernen Multicenterdesign das durchschnittliche Infarktvolumen und die Mortalität signifikant reduzierte. Auch die Menge an kortikal infiltrierenden Neutrophilen Granulozyten im Bereich des Schlaganfalls konnte signifikant gemindert werden. Keinen Einfluss hatte die Behandlung auf das gemessene motorische Verhalten und den Gewichtsverlust der Tiere. Dies ist die erste präklinische randomisierte kontrollierte Multicenterstudie, die ein positives Ergebnis in einem Ischämie Reperfusions Modell des Schlagnfalls nachweisen konnte und die zweite erfolgreiche präklinische randomisierte kontrollierte Multicenterstudie im Schlaganfallmodell der Maus überhaupt.

Die Ergebnisse dieser Studie legen eine Basis für weitere tierexperimentelle und perspektivisch auch humane Studien zur Wirksamkeit einer IL-17A Neutralisierung im ischämischen Schlaganfall. Hiermit wäre es möglich die i.v. Lyse und die mechanische Rekanalisation um eine weitere Therapiemöglichkeit im Sinne einer Suppression der IL-17A Aktivität zu ergänzen. In diesem Zusammenhang können die vorliegenden Daten auch hilfreich sein, um eine geeignete Stichprobe für humane Studien zu definieren, in der die Wahrscheinlichkeit einen positiven Effekt durch die anti-IL-17A Therapie zu finden am größten ist.

7 Summary

The aim of the study was to demonstrate the effectiveness of treatment with anti-IL-17A antibodies in a preclinical, randomized and placebo-controlled multicenter study. The basis for conducting this study lay in the positive monocentric study data on the role of IL-17A in a mouse stroke model (Gelderblom et al. 2012, Shichita et al. 2009).

In this study, we were able to show that treatment with a neutralizing anti-IL-17A antibody significantly reduced the average infarct volume and mortality, even in a modern multicenter design. The amount of cortical infiltrating neutrophilic granulocytes in the area of the stroke could also be significantly reduced. The treatment had no effect on the measured motor behavior and the weight loss of the animals. This is the first multicenter preclinical randomized controlled trial to show a positive outcome in an ischemia reperfusion stroke model and the second successful multicenter preclinical randomized controlled trial in a mouse stroke model ever.

The results of this study provide a basis for further animal experiments and prospectively also human studies on the effectiveness of IL-17A neutralization in ischemic stroke. This would make it possible to add another therapy option to the i.v. Lysis and mechanical recanalization in terms of suppressing IL-17A activity. In this context, the available data can also be helpful in defining a suitable sample for human studies in which the probability of finding a positive effect from anti-IL-17A therapy is greatest.

8 Abkürzungsverzeichnis

ACA: Arteria Cerebri Anterior

ACC: Arteria Carotis Communis

ACE: Arteria Carotis Externa

ACI: Arteria Carotis Interna

ACM: Arteria Cerebri Media

ACP: Arteria Cerebri Posterior

ADC: Apparant Diffusion Coefficient

BA: Arteria Basilaris

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

CCL2: CC chemokine ligand 2

CCR2: CC chemokine receptor type 2

CXCL-1: Chemokine (CXC Motif) Ligand 1

CXCR2: CXC Motif Chemokinrezeptor 2

CT: Computertomographie

DALYs: Disability-adjusted life-years

DAMP: Danger Associated Molecular Patterns

DWI: Diffusion Weighted Images

EAE: Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

FLAIR: Fluid attenuated inversion recovery

ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1

IFN- γ: Interferon Gamma

IgG: Immunglobulin G

IL-1β: Interleukin-1 beta

IL-1Ra: Interleukin-1 Rezeptor Antagonist

IL-6: Interleukin-6

IL-10: Interleukin-10

IL-17A: Interleukin-17 α

IL-23: Interleukin-23

IVC: Individually Ventilated Cage

i.p.: Intraperitoneal

i.v.: Intravenös

LDL: Low-density Lipoprotein

Ly6G: Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D

MHC: Major Histocompatibility Complex

MMP-9: Matrixmetalloproteinase 9

mRS. Modified Rankin Scale

MRT: Magnetresonanztomographie

MPS: Mononukleäres phagozytierendes System

NIHSS: NIH-Stroke Scale

OGD: Oxygen Glucose Deprivation

OP: Operation

PBS: Phosphate-buffered saline

PFA: Paraformaldehyde

pMCAO: Permanent middle cerebral artery occlusion

s.c.: Subcutan

TGF-β: Transforming Growth Factor Beta

tMCAO: Transient middle cerebral artery occlusion

TNF-α: Tumor Necrosis Factor Alpha

WHO: World Health Organization

ZNS: Zentrales Nervensystem

γδ-T-Zellen: Gamma-Delta T-Zellen

9 Literaturzitate

1. Aiba I, Shuttleworth CW. Sustained NMDA receptor activation by spreading depolarizations can initiate excitotoxic injury in metabolically compromised neurons: Neuronal injury following spreading depolarization. The Journal of Physiology. 15. November 2012;590(22):5877–93.

2. Alves de Lima K, Rustenhoven J, Da Mesquita S, Wall M, Salvador AF, Smirnov I, u. a. Meningeal γδ T cells regulate anxiety-like behavior via IL-17a signaling in neurons. Nature Immunology. November 2020;21(11):1421–9.

3. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. Annu Rev Immunol. 2012;30:459–89.

4. Arumugam TV, Chan SL, Jo D-G, Yilmaz G, Tang S-C, Cheng A, u. a. Gamma secretase–mediated Notch signaling worsens brain damage and functional outcome in ischemic stroke. Nature Medicine. Juni 2006;12(6):621–3.

5. Arunachalam P, Ludewig P, Melich P, Arumugam TV, Gerloff C, Prinz I, u. a. CCR6 (CC Chemokine Receptor 6) Is Essential for the Migration of Detrimental Natural Interleukin-17–Producing γδ T Cells in Stroke. Stroke. Juli 2017;48(7):1957–65.

6. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. Stroke. November 1981;12(6):723–5.

7. Auten RL, Davis JM. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. Pediatr Res. August 2009;66(2):121–7.

8. Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. Nature News. 26. Mai 2016;533(7604):452.

9. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke. Mai 1986;17(3):472–6.

10. Benakis C, Brea D, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, u. a. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal γδ T cells. Nature Medicine. Mai 2016;22(5):516–23.

11. Bernardo-Castro S, Sousa JA, Brás A, Cecília C, Rodrigues B, Almendra L, u. a. Pathophysiology of Blood–Brain Barrier Permeability Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. Front Neurol. 9. Dezember 2020;11:594672.

12. Bieber M, Gronewold J, Scharf A-C, Schuhmann MK, Langhauser F, Hopp S, u. a. Validity and Reliability of Neurological Scores in Mice Exposed to Middle Cerebral Artery Occlusion. Stroke. Oktober 2019;50(10):2875–82.
13. Bird SR, Hawley JA. Update on the effects of physical activity on insulin sensitivity in humans. BMJ Open Sport Exerc Med. März 2017;2(1):e000143.
14. Bladin C F, Chambers B R. Frequency and pathogenesis of hemodynamic stroke. Stroke. 1. November 1994;25(11):2179–82.
15. Boehme AK, Esenwa C, Elkind MSV. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. Circ Res. 3. Februar 2017;120(3):472–95.
16. Bohm I. Apoptosis: The Complex Scenario for a Silent Cell Death. Molecular Imaging & Biology. Januar 2003;5(1):2–14.
17. Boltze J, Ayata C, Wagner D-C, Plesnila N. Preclinical Phase III Trials in Translational Stroke Research: Call for Collective Design of Framework and Guidelines. Stroke. Februar 2014;45(2):357–357.
18. Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ. Role of IL-1α and IL-1β in Ischemic Brain Damage. J Neurosci. 1. August 2001;21(15):5528–34.
19. Brigas HC, Ribeiro M, Coelho JE, Gomes R, Gomez-Murcia V, Carvalho K, u. a. IL-17 triggers the onset of cognitive and synaptic deficits in early stages of Alzheimer's disease. Cell Reports. August 2021;36(9):109574.
20. Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. Stroke [Internet]. Mai 2009 [zitiert 26. Juli 2021];40(5). Verfügbar unter: https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.108.531632
21. Burda JE, Sofroniew MV. Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease. Neuron. Januar 2014;81(2):229–48.
22. Buttini M, Appel K, Sauter A, Gebicke-Haerter P-J, Boddeke HWGM. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat. Neuroscience. März 1996;71(1):1–16.
23. Chaitanya GV, Eeka P, Munker R, Alexander JS, Babu PP. Role of Cytotoxic Protease Granzyme-b in Neuronal Degeneration During Human Stroke: Granzyme-b Induces Post-Ischemic Neurodegeneration. Brain Pathology. Januar 2011;21(1):16–30.
24. Chalos V, van der Ende NAM, Lingsma HF, Mulder MJHL, Venema E, Dijkland SA, u. a. National Institutes of Health Stroke Scale: An Alternative Primary Outcome

Measure for Trials of Acute Treatment for Ischemic Stroke. Stroke. Januar 2020;51(1):282–90.
25. Chen C, Itakura E, Nelson GM, Sheng M, Laurent P, Fenk LA, u. a. IL-17 is a neuromodulator of Caenorhabditis elegans sensory responses. Nature. Februar 2017;542(7639):43–8.
26. Chen J, Liu X, Zhong Y. Interleukin-17A: The Key Cytokine in Neurodegenerative Diseases. Front Aging Neurosci. 29. September 2020;12:566922.
27. Chen X, Kintner DB, Luo J, Baba A, Matsuda T, Sun D. Endoplasmic reticulum Ca^{2+} dysregulation and endoplasmic reticulum stress following *in vitro* neuronal ischemia: role of Na^{+}-K^{+}-Cl^{-} cotransporter. Journal of Neurochemistry. August 2008;106(4):1563–76.
28. Chen Y, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Bol D, Thomas K, Berman NEJ, u. a. Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in the Brain Exacerbates Ischemic Brain Injury and is Associated with Recruitment of Inflammatory Cells. J Cereb Blood Flow Metab. 1. Juni 2003;23(6):748–55.
29. Choi JY, Kim JY, Kim JY, Park J, Lee WT, Lee JE. M2 Phenotype Microglia-derived Cytokine Stimulates Proliferation and Neuronal Differentiation of Endogenous Stem Cells in Ischemic Brain. Exp Neurobiol. 28. Februar 2017;26(1):33–41.
30. Chu HX, Broughton BRS, Ah Kim H, Lee S, Drummond GR, Sobey CG. Evidence That Ly6C ^{hi} Monocytes Are Protective in Acute Ischemic Stroke by Promoting M2 Macrophage Polarization. Stroke. Juli 2015;46(7):1929–37.
31. Clarkson BDS, Ling C, Shi Y, Harris MG, Rayasam A, Sun D, u. a. T cell–derived interleukin (IL)-21 promotes brain injury following stroke in mice. Journal of Experimental Medicine. 7. April 2014;211(4):595–604.
32. Clausen BH, Degn M, Martin NA, Couch Y, Karimi L, Ormhøj M, u. a. Systemically administered anti-TNF therapy ameliorates functional outcomes after focal cerebral ischemia. Journal of Neuroinflammation. 12. Dezember 2014;11(1):203.
33. Crabbe JC. Genetics of Mouse Behavior: Interactions with Laboratory Environment. Science. 4. Juni 1999;284(5420):1670–2.

34. Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, Nombela F, Vivancos J, Hamilton JA, u. a. N2 Neutrophils, Novel Players in Brain Inflammation After Stroke: Modulation by the PPARγ Agonist Rosiglitazone. Stroke. Dezember 2013;44(12):3498–508.
35. Davies CA, Loddick SA, Toulmond S, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ. The Progression and Topographic Distribution of Interleukin-1β Expression after Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. J Cereb Blood Flow Metab. 1. Januar 1999;19(1):87–98.
36. Deng W, Mandeville E, Terasaki Y, Li W, Holder J, Chuang AT, u. a. Transcriptomic characterization of microglia activation in a rat model of ischemic stroke. J Cereb Blood Flow Metab. Dezember 2020;40(1_suppl):S34–48.
37. Dimitrijevic Oliver B., Stamatovic Svetlana M., Keep Richard F., Andjelkovic Anuska V. Absence of the Chemokine Receptor CCR2 Protects Against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. Stroke. 1. April 2007;38(4):1345–53.
38. Dirnagl U, Hakim A, Macleod M, Fisher M, Howells D, Alan SM, u. a. A Concerted Appeal for International Cooperation in Preclinical Stroke Research. Stroke. Juni 2013;44(6):1754–60.
39. Eckstein H, Kühnl A, Berkefeld J, Lawall H, Storck M, Sander M. Clinical practice guideline: Diagnosis, treatment and follow-up in extracranial carotid stenosis. Dtsch Arztebl Int. 2020;
40. Elkind MSV, Veltkamp R, Montaner J, Johnston SC, Singhal AB, Becker K, u. a. Natalizumab in acute ischemic stroke (ACTION II): A randomized, placebo-controlled trial. Neurology. 25. August 2020;95(8):e1091–104.
41. Elkins J, Veltkamp R, Montaner J, Johnston SC, Singhal AB, Becker K, u. a. Safety and efficacy of natalizumab in patients with acute ischaemic stroke (ACTION): a randomised, placebo-controlled, double-blind phase 2 trial. The Lancet Neurology. 1. März 2017;16(3):217–26.
42. Emsley HCA, Smith CJ, Georgiou RF, Vail A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, u. a. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 1. Oktober 2005;76(10):1366–72.
43. Endres M, Diener H-C, Röther J. LL-23-II-Sekundärprophylaxe ischämischer Schlaganfall und transitorische ischämische Attacke - Deutsche Gesellschaft für Neurologie e. V. [Internet]. Deutsche Gesellschaft für Neurologie e. V. 2015 [zitiert 16. Dezember 2020]. Verfügbar unter: https://dgn.org/leitlinien/ll-23-ll-

sekundaerprophylaxe-ischaemischer-schlaganfall-und-transitorische-ischaemische-attacke/
44. Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: Results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. Neurology. 23. Oktober 2001;57(8):1428–34.
45. Evavold CL, Ruan J, Tan Y, Xia S, Wu H, Kagan JC. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. Immunity. Januar 2018;48(1):35-44.e6.
46. Feigin Valery L., Norrving Bo, Mensah George A. Global Burden of Stroke. Circulation Research. 3. Februar 2017;120(3):439–48.
47. Franke M, Bieber M, Kraft P, Weber ANR, Stoll G, Schuhmann MK. The NLRP3 inflammasome drives inflammation in ischemia/reperfusion injury after transient middle cerebral artery occlusion in mice. Brain, Behavior, and Immunity. Dezember 2020;S0889159120324521.
48. Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC. Neuronal Cell Death. Physiological Reviews. 1. April 2018;98(2):813–80.
49. Fu Y, Zhang N, Ren L, Yan Y, Sun N, Li Y-J, u. a. Impact of an immune modulator fingolimod on acute ischemic stroke. Proc Natl Acad Sci USA. 23. Dezember 2014;111(51):18315–20.
50. Galea J, Ogungbenro K, Hulme S, Patel H, Scarth S, Hoadley M, u. a. Reduction of inflammation after administration of interleukin-1 receptor antagonist following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of the Subcutaneous Interleukin-1Ra in SAH (SCIL-SAH) study. Journal of Neurosurgery. 24. Februar 2017;128(2):515–23.
51. Garcia JH, Liu KF, Relton JK. Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. Am J Pathol. November 1995;147(5):1477–86.
52. Garcia JM, Stillings SA, Leclerc JL, Phillips H, Edwards NJ, Robicsek SA, u. a. Role of Interleukin-10 in Acute Brain Injuries. Front Neurol. 12. Juni 2017;8:244.
53. Garcia JH, Ho K-L. Pathology of Hypertensive Arteriopathy. Neurosurgery Clinics of North America. 1. Juli 1992;3(3):497–507.
54. García-Culebras A, Durán-Laforet V, Peña-Martínez C, Moraga A, Ballesteros I, Cuartero MI, u. a. Role of TLR4 (Toll-Like Receptor 4) in N1/N2 Neutrophil Programming After Stroke. Stroke. Oktober 2019;50(10):2922–32.

55. Gauberti M, De Lizarrondo SM, Vivien D. The “inflammatory penumbra” in ischemic stroke: From clinical data to experimental evidence. European Stroke Journal. März 2016;1(1):20–7.
56. Gelderblom M, Gallizioli M, Ludewig P, Thom V, Arunachalam P, Rissiek B, u. a. IL-23 (Interleukin-23)–Producing Conventional Dendritic Cells Control the Detrimental IL-17 (Interleukin-17) Response in Stroke. Stroke. Januar 2018;49(1):155–64.
57. Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe C-U, Siler DA, u. a. Temporal and Spatial Dynamics of Cerebral Immune Cell Accumulation in Stroke. Stroke. Mai 2009;40(5):1849–57.
58. Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, u. a. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. Blood. 1. November 2012;120(18):3793–802.
59. Gerriets T., Stolz E., Walberer M., Müller C., Kluge A., Bachmann A., u. a. Noninvasive Quantification of Brain Edema and the Space-Occupying Effect in Rat Stroke Models Using Magnetic Resonance Imaging. Stroke. 1. Februar 2004;35(2):566–71.
60. Ghoreschi K, Laurence A, Yang X-P, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, u. a. Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF-β signalling. Nature. Oktober 2010;467(7318):967–71.
61. Gidday JM, Gasche YG, Copin J-C, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, u. a. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 1. August 2005;289(2):H558–68.
62. Goepfert A, Lehmann S, Wirth E, Rondeau J-M. The human IL-17A/F heterodimer: a two-faced cytokine with unique receptor recognition properties. Sci Rep. Dezember 2017;7(1):8906.
63. Gordon KB, Blauvelt A, Papp KA, Langley RG, Luger T, Ohtsuki M, u. a. Phase 3 Trials of Ixekizumab in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. N Engl J Med. 28. Juli 2016;375(4):345–56.
64. Griffin GK, Newton G, Tarrio ML, Bu D, Maganto-Garcia E, Azcutia V, u. a. IL-17 and TNF-α Sustain Neutrophil Recruitment during Inflammation through Synergistic Effects on Endothelial Activation. JI. 15. Juni 2012;188(12):6287–99.

65. Grønberg NV, Johansen FF, Kristiansen U, Hasseldam H. Leukocyte infiltration in experimental stroke. J Neuroinflammation. Dezember 2013;10(1):892.
66. Gülke E, Gelderblom M, Magnus T. Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. Ther Adv Neurol Disord. 1. Januar 2018;11:1756286418774254.
67. Han D, Liu H, Gao Y. The role of peripheral monocytes and macrophages in ischemic stroke. Neurol Sci. Dezember 2020;41(12):3589–607.
68. Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, u. a. Inhibition of interleukin 1 converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. Proceedings of the National Academy of Sciences. 4. März 1997;94(5):2007–12.
69. Haverich A, Boyle EC. Atherosclerosis Risk Factors. In: Haverich A, Boyle EC, Herausgeber. Atherosclerosis Pathogenesis and Microvascular Dysfunction [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [zitiert 16. Dezember 2020]. S. 9–45. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-030-20245-3_2
70. Heindl S, Ricci A, Carofiglio O, Zhou Q, Arzberger T, Lenart N, u. a. Chronic T cell proliferation in brains after stroke could interfere with the efficacy of immunotherapies. Journal of Experimental Medicine. 2. August 2021;218(8):e20202411.
71. Heiss W-D, Weber OZ. Validation of MRI Determination of the Penumbra by PET Measurements in Ischemic Stroke. Journal of Nuclear Medicine. 1. Februar 2017;58(2):187–93.
72. Hemphill J. Claude, Greenberg Steven M., Anderson Craig S., Becker Kyra, Bendok Bernard R., Cushman Mary, u. a. Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. Stroke. 1. Juli 2015;46(7):2032–60.
73. Hennerici MG, Kern R. S1-Leitlinie Diagnostik akuter zerebrovaskulärer Erkrankungen. 2017. In: Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 2017;
74. Hermann DM, Kleinschnitz C, Gunzer M. Implications of polymorphonuclear neutrophils for ischemic stroke and intracerebral hemorrhage: Predictive value, pathophysiological consequences and utility as therapeutic target. Journal of Neuroimmunology. August 2018;321:138–43.

75. Herz J, Filiano AJ, Smith A, Yogev N, Kipnis J. Myeloid Cells in the Central Nervous System. Immunity. 20. Juni 2017;46(6):943–56.
76. Hinzman JM, DiNapoli VA, Mahoney EJ, Gerhardt GA, Hartings JA. Spreading depolarizations mediate excitotoxicity in the development of acute cortical lesions. Experimental Neurology. Mai 2015;267:243–53.
77. Hossmann K-A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. Annals of Neurology. 1994;36(4):557–65.
78. Hou Y, Yang D, Xiang R, Wang H, Wang X, Zhang H, u. a. N2 neutrophils may participate in spontaneous recovery after transient cerebral ischemia by inhibiting ischemic neuron injury in rats. International Immunopharmacology. Dezember 2019;77:105970.
79. Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, u. a. Microglia/Macrophage Polarization Dynamics Reveal Novel Mechanism of Injury Expansion After Focal Cerebral Ischemia. Stroke. November 2012;43(11):3063–70.
80. Hum PD, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Kaler LJ, Vandenbark AA, u. a. T- and B-Cell-Deficient Mice with Experimental Stroke have Reduced Lesion Size and Inflammation. J Cereb Blood Flow Metab. November 2007;27(11):1798–805.
81. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. Nat Med. Juli 2011;17(7):796–808.
82. Jickling GC, Liu D, Ander BP, Stamova B, Zhan X, Sharp FR. Targeting Neutrophils in Ischemic Stroke: Translational Insights from Experimental Studies. J Cereb Blood Flow Metab. 1. Juni 2015;35(6):888–901.
83. Jin W-N, Shi SX-Y, Li Z, Li M, Wood K, Gonzales RJ, u. a. Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. J Cereb Blood Flow Metab. Juni 2017;37(6):2224–36.
84. Johann S, Heitzer M, Kanagaratnam M, Goswami A, Rizo T, Weis J, u. a. NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. Glia. 2015;63(12):2260–73.
85. Kang R, Gamdzyk M, Lenahan C, Tang J, Tan S, Zhang JH. The Dual Role of Microglia in Blood-Brain Barrier Dysfunction after Stroke. CN. 1. Dezember 2020;18(12):1237–49.

86. Kao Y-CJ, Li W, Lai H-Y, Oyarzabal EA, Lin W, Shih Y-YI. Dynamic perfusion and diffusion MRI of cortical spreading depolarization in photothrombotic ischemia. Neurobiology of Disease. November 2014;71:131–9.
87. Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, u. a. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. Cell Death Dis. März 2013;4(3):e525–e525.
88. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundörfer B, u. a. Lifetime Cost of Ischemic Stroke in Germany: Results and National Projections From a Population-Based Stroke Registry: The Erlangen Stroke Project. Stroke. Mai 2006;37(5):1179–83.
89. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol. April 2009;27(1):485–517.
90. Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, Knetzger KJ, Wharton MB, McCartney JS, u. a. Effects of the Amount and Intensity of Exercise on Plasma Lipoproteins. N Engl J Med. 7. November 2002;347(19):1483–92.
91. Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. Progress in Neurobiology. April 2014;115:157–88.
92. Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, u. a. Microglia Protect Neurons against Ischemia by Synthesis of Tumor Necrosis Factor. Journal of Neuroscience. 4. Februar 2009;29(5):1319–30.
93. Lambertsen KL, Finsen B, Clausen BH. Post-stroke inflammation—target or tool for therapy? Acta Neuropathol. Mai 2019;137(5):693–714.
94. Lee S-H. Cerebral Small Vessel Disease. In: Lee S-H, Herausgeber. Stroke Revisited: Pathophysiology of Stroke: From Bench to Bedside [Internet]. Singapore: Springer; 2020 [zitiert 15. Dezember 2020]. S. 61–79. (Stroke Revisited). Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-981-10-1430-7_6
95. Leigh R, Knutsson L, Zhou J, van Zijl PC. Imaging the physiological evolution of the ischemic penumbra in acute ischemic stroke. J Cereb Blood Flow Metab. 1. September 2018;38(9):1500–16.
96. Li G-Z, Zhong D, Yang L-M, Sn B, Zhong Z-H, Yin Y-H, u. a. Expression of Interleukin-17 in Ischemic Brain Tissue. Scand J Immunol. November 2005;62(5):481–6.
97. Li H, Tsokos GC. IL-23/IL-17 Axis in Inflammatory Rheumatic Diseases. Clinic Rev Allerg Immunol. Februar 2021;60(1):31–45.

98. Li J, Zheng M, Shimoni O, Banks WA, Bush AI, Gamble JR, u. a. Development of Novel Therapeutics Targeting the Blood–Brain Barrier: From Barrier to Carrier. Adv Sci. 3. Juni 2021;2101090.
99. Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. Nature Reviews Immunology. April 2018;18(4):225–42.
100. Li X, Bechara R, Zhao J, McGeachy MJ, Gaffen SL. IL-17 receptor–based signaling and implications for disease. Nat Immunol. Dezember 2019;20(12):1594–602.
101. Li Y, Chu N, Hu A, Gran B, Rostami A, Zhang G-X. Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. Brain. 1. Februar 2007;130(2):490–501.
102. Li Y, Chopp M, Jiang N, Yao F, Zaloga C. Temporal Profile of in situ DNA Fragmentation after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. J Cereb Blood Flow Metab. Mai 1995;15(3):389–97.
103. Li Z, Song Y, He T, Wen R, Li Y, Chen T, u. a. M2 microglial small extracellular vesicles reduce glial scar formation *via* the miR-124/STAT3 pathway after ischemic stroke in mice. Theranostics. 2021;11(3):1232–48.
104. Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D, Constantin G. Functional morphology of the blood–brain barrier in health and disease. Acta Neuropathol. März 2018;135(3):311–36.
105. Liesz A, Zhou W, Mracskó É, Karcher S, Bauer H, Schwarting S, u. a. Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. Brain. März 2011;134(3):704–20.
106. Liesz A, Zhou W, Mracskó É, Karcher S, Bauer H, Schwarting S, u. a. Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. Brain. 1. März 2011;134(3):704–20.
107. Lin Y, Zhang J-C, Yao C-Y, Wu Y, Abdelgawad AF, Yao S-L, u. a. Critical role of astrocytic interleukin-17 A in post-stroke survival and neuronal differentiation of neural precursor cells in adult mice. Cell Death Dis. Juni 2016;7(6):e2273–e2273.
108. Liu S, Zhen G, Meloni BP, Campbell K, Winn HR. RODENT STROKE MODEL GUIDELINES FOR PRECLINICAL STROKE TRIALS (1ST EDITION). Journal of Experimental Stroke and Translational Medicine. Januar 2009;2(2):2–27.

109. Liu T, Li S, Ying S, Tang S, Ding Y, Li Y, u. a. The IL-23/IL-17 Pathway in Inflammatory Skin Diseases: From Bench to Bedside. Front Immunol. 17. November 2020;11:594735.
110. Liu X, Liu J, Zhao S, Zhang H, Cai W, Cai M, u. a. Interleukin-4 Is Essential for Microglia/Macrophage M2 Polarization and Long-Term Recovery After Cerebral Ischemia. Stroke. Februar 2016;47(2):498–504.
111. Llovera G, Hofmann K, Roth S, Salas-Pérdomo A, Ferrer-Ferrer M, Perego C, u. a. Results of a preclinical randomized controlled multicenter trial (pRCT): Anti-CD49d treatment for acute brain ischemia. Sci Transl Med. 5. August 2015;7(299):299ra121-299ra121.
112. Loh KY, Wang Z, Liao P. Oncotic Cell Death in Stroke. In: de Tombe P, Gudermann T, Jahn R, Lill R, Herausgeber. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology 176 [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [zitiert 22. Juli 2021]. S. 37–64. (Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology; Bd. 176). Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/112_2018_13
113. Lourbopoulos A, Mourouzis I, Xinaris C, Zerva N, Filippakis K, Pavlopoulos A, u. a. Translational Block in Stroke: A Constructive and “Out-of-the-Box” Reappraisal. Front Neurosci. 14. Mai 2021;15:652403.
114. Low-Marchelli J. STRATEGIES TO MINIMIZE GENETIC DRIFT AND MAXIMIZE EXPERIMENTAL REPRODUCIBILITY IN MOUSE RESEARCH [Internet]. 2017 [zitiert 17. Februar 2021]. Verfügbar unter: https://www.semanticscholar.org/paper/STRATEGIES-TO-MINIMIZE-GENETIC-DRIFT-AND-MAXIMIZE/97852bffddcc74b819175b48e27f606d63899d27
115. Malhotra K, Chang JJ, Khunger A, Blacker D, Switzer JA, Goyal N, u. a. Minocycline for acute stroke treatment: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. J Neurol. August 2018;265(8):1871–9.
116. Man JJ, Beckman JA, Jaffe IZ. Sex as a Biological Variable in Atherosclerosis. Circ Res. 24. April 2020;126(9):1297–319.
117. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, u. a. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. Nature. Januar 2004;427(6972):355–60.
118. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. Immunity. April 2019;50(4):892–906.

119. Mehndiratta P, Manjila S, Ostergard T, Eisele S, Cohen ML, Sila C, u. a. Cerebral amyloid angiopathy–associated intracerebral hemorrhage: pathology and management. Neurosurgical Focus. 1. April 2012;32(4):E7.
120. Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death: Caspase-1-induced pyroptotic cell death. Immunological Reviews. September 2011;243(1):206–14.
121. Morita CT, Mariuzza RA, Brenner MB. Antigen recognition by human γδ T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. Springer Semin Immunopathol. September 2000;22(3):191–217.
122. Moussaddy A, Demchuk AM, Hill MD. Thrombolytic therapies for ischemic stroke: Triumphs and future challenges. Neuropharmacology. 15. Mai 2018;134:272–9.
123. Müller MD, Lyrer P, Brown MM, Bonati LH. Carotid artery stenting versus endarterectomy for treatment of carotid artery stenosis. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. 2020 [zitiert 16. Dezember 2020];(2). Verfügbar unter:
https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD000515.pub5/full
124. National Research Council (U.S.), Institute for Laboratory Animal Research (U.S.), National Academies Press (U.S.), Herausgeber. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, D.C: National Academies Press; 2011. 220 S.
125. Nedergaard M. Neuronal injury in the infarct border: a neuropathological study in the rat. Acta Neuropathol. 1987;73(3):267–74.
126. Neumann J, Henneberg S, Kenne S von, Nolte N, Müller AJ, Schraven B, u. a. Beware the intruder: Real time observation of infiltrated neutrophils and neutrophil—Microglia interaction during stroke in vivo. PLOS ONE. 15. März 2018;13(3):e0193970.
127. Neumann-Haefelin T, Wittsack H-J, Wenserski F, Siebler M, Seitz RJ, Mödder U, u. a. Diffusion- and Perfusion-Weighted MRI: The DWI/PWI Mismatch Region in Acute Stroke. Stroke. August 1999;30(8):1591–7.
128. Nielsen MM, Witherden DA, Havran WL. γδ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. Nature Reviews Immunology. Dezember 2017;17(12):733–45.

129. Ono K, Suzuki H, Sawada M. Delayed neural damage is induced by iNOS-expressing microglia in a brain injury model. Neuroscience Letters. April 2010;473(2):146–50.
130. Orellana-Urzúa S, Rojas I, Líbano L, Rodrigo R. Pathophysiology of Ischemic Stroke: Role of Oxidative Stress. CPD. 13. Oktober 2020;26(34):4246–60.
131. Pan Y, Tian D, Wang H, Zhao Y, Zhang C, Wang S, u. a. Inhibition of Perforin-Mediated Neurotoxicity Attenuates Neurological Deficits After Ischemic Stroke. Front Cell Neurosci. 28. Juni 2021;15:664312.
132. Panel null, Mohr J. P., Albers Gregory W., Amarenco Pierre, Babikian Viken L., Biller José, u. a. Etiology of Stroke. Stroke. 1. Juli 1997;28(7):1501–6.
133. Papotto PH, Ribot JC, Silva-Santos B. IL-17+ γδ T cells as kick-starters of inflammation. Nat Immunol. Juni 2017;18(6):604–11.
134. Pedragosa J, Miró-Mur F, Otxoa-de-Amezaga A, Justicia C, Ruíz-Jaén F, Ponsaerts P, u. a. CCR2 deficiency in monocytes impairs angiogenesis and functional recovery after ischemic stroke in mice. J Cereb Blood Flow Metab. Dezember 2020;40(1_suppl):S98–116.
135. Perez-de-Puig I, Miró-Mur F, Ferrer-Ferrer M, Gelpi E, Pedragosa J, Justicia C, u. a. Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. Acta Neuropathol. Februar 2015;129(2):239–57.
136. Piepke M, Clausen BH, Ludewig P, Vienhues JH, Bedke T, Javidi E, u. a. Interleukin-10 improves stroke outcome by controlling the detrimental Interleukin-17A response. J Neuroinflammation. Dezember 2021;18(1):265.
137. Pinckard K, Baskin KK, Stanford KI. Effects of Exercise to Improve Cardiovascular Health. Front Cardiovasc Med. 4. Juni 2019;6:69.
138. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, u. a. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. N Engl J Med. 2. März 2006;354(9):899–910.
139. Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. Cell. 3. Oktober 2019;179(2):292–311.
140. Qin C, Zhou L-Q, Ma X-T, Hu Z-W, Yang S, Chen M, u. a. Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke. Neurosci Bull. 1. Oktober 2019;35(5):921–33.
141. Rajan WD, Wojtas B, Gielniewski B, Gieryng A, Zawadzka M, Kaminska B. Dissecting functional phenotypes of microglia and macrophages in the rat brain after transient cerebral ischemia. Glia. Februar 2019;67(2):232–45.

142. Ramos-Cabrer P, Padro D. MRI in the Study of Animal Models of Stroke. In: García Martín ML, López Larrubia P, Herausgeber. Preclinical MRI [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2018 [zitiert 18. Februar 2021]. S. 377–92. Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7531-0_22

143. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. Nat Rev Immunol. September 2012;12(9):623–35.

144. Reed MD, Yim YS, Wimmer RD, Kim H, Ryu C, Welch GM, u. a. IL-17a promotes sociability in mouse models of neurodevelopmental disorders. Nature. 9. Januar 2020;577(7789):249–53.

145. Ribeiro M, Brigas HC, Temido-Ferreira M, Pousinha PA, Regen T, Santa C, u. a. Meningeal γδ T cell–derived IL-17 controls synaptic plasticity and short-term memory. Science Immunology [Internet]. 11. Oktober 2019 [zitiert 9. Oktober 2020];4(40). Verfügbar unter: https://immunology.sciencemag.org/content/4/40/eaay5199

146. Ribeiro ST, Ribot JC, Silva-Santos B. Five Layers of Receptor Signaling in Î³Î´ T-Cell Differentiation and Activation. Front Immunol [Internet]. 26. Januar 2015 [zitiert 8. September 2021];6. Verfügbar unter: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00015/abstract

147. Ribot JC, deBarros A, Pang DJ, Neves JF, Peperzak V, Roberts SJ, u. a. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-γ- and interleukin 17–producing γδ T cell subsets. Nature Immunology. April 2009;10(4):427–36.

148. Richter SH, Garner JP, Würbel H. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? Nat Methods. April 2009;6(4):257–61.

149. Ringleb P, Köhrmann M, jansen. Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls, S2e-Leitlinie. 22. September 2021;

150. Salvarani C, Brown RD, Hunder GG. Adult primary central nervous system vasculitis. The Lancet. 25. August 2012;380(9843):767–77.

151. Savage DG, Antman KH. Imatinib Mesylate — A New Oral Targeted Therapy [Internet]. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra013339. 2009 [zitiert 6. Januar 2021]. Verfügbar unter: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra013339

152. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener H-C, Levy EI, Pereira VM, u. a. Stent-Retriever Thrombectomy after Intravenous t-PA vs. t-PA Alone in Stroke. N Engl J Med. 11. Juni 2015;372(24):2285–95.
153. Schaefer PW, Grant PE, Gonzalez RG. Diffusion-weighted MR Imaging of the Brain. Radiology. 1. November 2000;217(2):331–45.
154. Scheinfeld N. A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor alpha blockers etanercept, infliximab and adalimumab. Journal of Dermatological Treatment. September 2004;15(5):280–94.
155. Schmidt-Pogoda A, Bonberg N, Koecke MHM, Strecker J-K, Wellmann J, Bruckmann N-M, u. a. Why Most Acute Stroke Studies Are Positive in Animals but Not in Patients: A Systematic Comparison of Preclinical, Early Phase, and Phase 3 Clinical Trials of Neuroprotective Agents. Annals of Neurology. 2020;87(1):40–51.
156. Seyhan AA. Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide – identification of problems and overcoming obstacles. transl med commun. Dezember 2019;4(1):18.
157. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S, Mardani F, u. a. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J Cell Physiol. September 2018;233(9):6425–40.
158. Shi K, Wood K, Shi F-D, Wang X, Liu Q. Stroke-induced immunosuppression and poststroke infection. Stroke Vasc Neurol. März 2018;3(1):34–41.
159. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, u. a. Pivotal role of cerebral interleukin-17–producing γδT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. Nat Med. August 2009;15(8):946–50.
160. Smith Craig J., Hulme Sharon, Vail Andy, Heal Calvin, Parry-Jones Adrian R., Scarth Sylvia, u. a. SCIL-STROKE (Subcutaneous Interleukin-1 Receptor Antagonist in Ischemic Stroke). Stroke. 1. Mai 2018;49(5):1210–6.
161. Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, u. a. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. BMC Neurology. 15. Januar 2004;4(1):2.
162. Staerk L, Sherer JA, Ko D, Benjamin EJ, Helm RH. Atrial Fibrillation: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Outcomes. Circ Res. 28. April 2017;120(9):1501–17.

163. Stanley K. Design of Randomized Controlled Trials. Circulation. 6. März 2007;115(9):1164–9.
164. Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, Folestad E, Cale J, Andrae J, u. a. Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. Nat Med. Juli 2008;14(7):731–7.
165. Sun L, Han R, Guo F, Chen H, Wang W, Chen Z, u. a. Antagonistic effects of IL-17 and Astragaloside IV on cortical neurogenesis and cognitive behavior after stroke in adult mice through Akt/GSK-3β pathway. Cell Death Discov. Dezember 2020;6(1):74.
166. Sun L, Zhang H, Wang W, Chen Z, Wang S, Li J, u. a. Astragaloside IV Exerts Cognitive Benefits and Promotes Hippocampal Neurogenesis in Stroke Mice by Downregulating Interleukin-17 Expression via Wnt Pathway. Front Pharmacol. 3. April 2020;11:421.
167. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KHG. Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from γδ T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity. Immunity. August 2009;31(2):331–41.
168. Svedin P, Hagberg H, Savman K, Zhu C, Mallard C. Matrix Metalloproteinase-9 Gene Knock-out Protects the Immature Brain after Cerebral Hypoxia-Ischemia. Journal of Neuroscience. 14. Februar 2007;27(7):1511–8.
169. Szalay G, Martinecz B, Lénárt N, Környei Z, Orsolits B, Judák L, u. a. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. Nature Communications. 3. Mai 2016;7(1):11499.
170. Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. Cell Calcium. Februar 2010;47(2):122–9.
171. Takano T, Tian G-F, Peng W, Lou N, Lovatt D, Hansen AJ, u. a. Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. Nat Neurosci. Juni 2007;10(6):754–62.
172. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human γδ T cells. Nature. Mai 1995;375(6527):155–8.
173. Thomalla G, Cheng B, Ebinger M, Hao Q, Tourdias T, Wu O, u. a. DWI-FLAIR mismatch for the identification of patients with acute ischaemic stroke within 4·5 h of symptom onset (PRE-FLAIR): a multicentre observational study. Lancet Neurol. November 2011;10(11):978–86.

174. Thomalla G, Simonsen CZ, Boutitie F, Andersen G, Berthezene Y, Cheng B, u. a. MRI-Guided Thrombolysis for Stroke with Unknown Time of Onset. New England Journal of Medicine [Internet]. 16. Mai 2018 [zitiert 15. Dezember 2020]; Verfügbar unter: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1804355
175. Tian D, Shi K, Zhu Z, Yao J, Yang X, Su L, u. a. Fingolimod enhances the efficacy of delayed alteplase administration in acute ischemic stroke by promoting anterograde reperfusion and retrograde collateral flow. Ann Neurol. November 2018;84(5):717–28.
176. Tobinick E. Rapid Improvement of Chronic Stroke Deficits after Perispinal Etanercept. CNS Drugs. 1. Februar 2011;25(2):145–55.
177. Tobinick E, Kim NM, Reyzin G, Rodriguez-Romanacce H, DePuy V. Selective TNF Inhibition for Chronic Stroke and Traumatic Brain Injury. CNS Drugs. 1. Dezember 2012;26(12):1051–70.
178. Tokuda Y, Inagawa T, Katoh Y, Kumano K, Ohbayashi N, Yoshioka H. Intracerebral hematoma in patients with ruptured cerebral aneurysms. Surgical Neurology. 1. März 1995;43(3):272–7.
179. Touzani O, Boutin H, LeFeuvre R, Parker L, Miller A, Luheshi G, u. a. Interleukin-1 Influences Ischemic Brain Damage in the Mouse Independently of the Interleukin-1 Type I Receptor. J Neurosci. 1. Januar 2002;22(1):38–43.
180. Tripepi G, Chesnaye NC, Dekker FW, Zoccali C, Jager KJ. Intention to treat and per protocol analysis in clinical trials. Nephrology. Juli 2020;25(7):513–7.
181. Uzdensky AB. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins. Apoptosis. Oktober 2019;24(9–10):687–702.
182. Veldhoen M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. Nature Immunology. Juni 2017;18(6):612–21.
183. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFβ in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. Immunity. Februar 2006;24(2):179–89.
184. Voelkl B, Vogt L, Sena ES, Würbel H. Reproducibility of preclinical animal research improves with heterogeneity of study samples. Wagenmakers E-J, Herausgeber. PLoS Biol. 22. Februar 2018;16(2):e2003693.

185. Wahlgren N, Thorén M, Höjeberg B, Käll T-B, Laska A-C, Sjöstrand C, u. a. Randomized assessment of imatinib in patients with acute ischaemic stroke treated with intravenous thrombolysis. J Intern Med. März 2017;281(3):273–83.
186. Wang D, Zhao Y, Wang G, Sun B, Kong Q, Zhao K, u. a. IL-17 potentiates neuronal injury induced by oxygen–glucose deprivation and affects neuronal IL-17 receptor expression. Journal of Neuroimmunology. Juli 2009;212(1–2):17–25.
187. Wang R, Zhu Y, Liu Z, Chang L, Bai X, Kang L, u. a. Neutrophil extracellular traps promote tPA-induced brain hemorrhage via cGAS in mice with stroke. Blood. 8. Juli 2021;138(1):91–103.
188. Wang X, Qiu L, Li Z, Wang X-Y, Yi H. Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases. Front Immunol. 9. November 2018;9:2456.
189. Wannamaker R, Buck B, Butcher K. Multimodal CT in Acute Stroke. Curr Neurol Neurosci Rep. September 2019;19(9):63.
190. Wei Y, Yemisci M, Kim H-H, Yung LM, Shin HK, Hwang S-K, u. a. Fingolimod provides long-term protection in rodent models of cerebral ischemia. Annals of Neurology. 2011;69(1):119–29.
191. Wojkowska D, Szpakowski P, Glabinski A. Interleukin 17A Promotes Lymphocytes Adhesion and Induces CCL2 and CXCL1 Release from Brain Endothelial Cells. IJMS. 8. Mai 2017;18(5):1000.
192. World Health Organization, Geneva Switzerland. WHO Global Health Estimates 2016 Summary Tables: Deaths by Cause, Age and Sey, By World Bank Income Group, 200-2015. 2018.
193. Xie L, Li W, Hersh J, Liu R, Yang S-H. Experimental ischemic stroke induces long-term T cell activation in the brain. J Cereb Blood Flow Metab. November 2019;39(11):2268–76.
194. Xiong X, Barreto GE, Xu L, Ouyang YB, Xie X, Giffard RG. Increased Brain Injury and Worsened Neurological Outcome in Interleukin-4 Knockout Mice After Transient Focal Cerebral Ischemia. Stroke. Juli 2011;42(7):2026–32.
195. Yang T, Guo R, Zhang F. Brain perivascular macrophages: Recent advances and implications in health and diseases. CNS Neurosci Ther. Dezember 2019;25(12):1318–28.

196. Yilmaz Gokhan, Arumugam Thiruma V., Stokes Karen Y., Granger D. Neil. Role of T Lymphocytes and Interferon-γ in Ischemic Stroke. Circulation. 2. Mai 2006;113(17):2105–12.
197. Zemke D, Majid A. The Potential of Minocycline for Neuroprotection in Human Neurologic Disease. Clinical Neuropharmacology. Dezember 2004;27(6):293–8.
198. Zhang D, Ren J, Luo Y, He Q, Zhao R, Chang J, u. a. T Cell Response in Ischemic Stroke: From Mechanisms to Translational Insights. Front Immunol. 15. Juli 2021;12:707972.
199. Zhang Rui Lan, Chopp Michael, Jiang Ning, Tang Wen Xue, Prostak Jonathan, Manning Anthony M., u. a. Anti–Intercellular Adhesion Molecule–1 Antibody Reduces Ischemic Cell Damage After Transient But Not Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in the Wistar Rat. Stroke. 1. August 1995;26(8):1438–43.
200. Zheng Y, Zhong D, Chen H, Ma S, Sun Y, Wang M, u. a. Pivotal role of cerebral interleukin-23 during immunologic injury in delayed cerebral ischemia in mice. Neuroscience. April 2015;290:321–31.
201. Zhu Z, Fu Y, Tian D, Sun N, Han W, Chang G, u. a. Combination of the Immune Modulator Fingolimod With Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Pilot Trial. Circulation. 22. September 2015;132(12):1104–12.

10 Danksagung

Eine Dissertation ist keine Einzelleistung, sondern bedarf vieler Unterstützter. In diesem Sinne möchte ich einigen Personen meinen ausdrücklichen und tiefen Dank aussprechen, die mich auf dem Weg begleitet haben.

Zunächst gehört der Dank meinem Doktorvater, PD Dr. Mathias Gelderblom. Zusammen haben wir viel Zeit, teilweise ganze Abende, bei der Interpretation und Diskussion der Ergebnisse und Daten verbracht. Beim Verfassen der Dissertation konnte ich stets auf konstruktive Kritik und Empfehlungen zählen. Ohne diesen ständigen und wichtigen Diskurs würde es diese Dissertation in dieser Form nicht geben.

Im Weiteren möchte ich allen an dem Projekt beteiligten Personen des ERSI Labors danken, hier ist zunächst Prof. Dr. Tim Magnus zu nennen, dem ich für die anregende Diskussion hinsichtlich der Planung, Durchführung und Diskussion der Ergebnisse danke. Ferner möchte ich den Personen danken, die mich in der Durchführung und Auswertung der Experimente unterstützt haben, im Wesentlichen sind dies Dr. Peter Ludewig, Ellen Orthey und Oliver Schnapauff.

Der Großteil der Arbeit, die für diese Dissertation notwendig war, fand im Labor statt. Nicht zu vernachlässigen ist jedoch auch die Zeit, in der man Unterstützung von geliebten Menschen bekommt.

In diesem Sinne möchte ich meiner Frau Kim herzlich danken. Du warst nicht nur eine ständige emotionale und motivationale Unterstützung, sondern konntest mir auch beim Verfassen und Korrigieren dieser Arbeit wesentlich helfen.

Zuletzt gilt der Dank meinen Eltern Anne und Burkhard und meiner Schwester Katharina, die mich in meinem akademischen Werdegang immer unterstützt und nie an mir gezweifelt haben.

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Koch
Vorname:	Simon
Anschrift:	Am Sandtorpark 8, 20457 Hamburg
Geburtsdatum:	04.06.1988
Geburtsort:	Hildesheim

Bildungseinrichtungen

1994 – 1998	Grundschule Sorsum, Hildesheim
1998 – 2007	Katholisches Gymnasium Marienschule, Hildesheim
26.06.2007	Allgemeine Hochschulreife
04.10.2007	Immatrikulation für den Studiengang Psychologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen
23.03.2009	Immatrikulation für den Studiengang Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
09/2012	Abschluss des Psychologiestudiums mit dem Bachelor of Science
05/2016	Abschluss des Medizinstudiums mit dem Staatsexamen
Seit 02/2021	Promotionsstudent der Universität Hamburg

Beruflicher Werdegang

Seit 11/2016	Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für Neurologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Weitere Erfahrungen

04/2009 bis 08/09	Hilfskraft an der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Abteilung der Allgemeinen Psychologie, Visuelle Neurowissenschaften, Mitbetreuung des Seminars Visuelle Wahrnehmung
01/2013 bis 06/13	Auslandsaufenthalt an der Universitetet i Bergen, Norwegen im Rahmen des Erasmus Programms

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....

13 Anhang

Studienprotokoll

Preclinical randomized controlled multicenter trial to assess the efficiency of an anti-IL17A antibody treatment in MCAO

1.1 Background:

Several studies in experimental stroke have shown, that the disruption of the IL-17 axis is protective in stroke[1-3]. In murine models of stroke *Il17a*$^{-/-}$[1] and *Il17ra*$^{-/-}$[2] mice were protected from ischemic tissue damage and anti-IL-17A antibody treatments[2] improved neurological outcomes. Currently available studies were performed in single centers.
To overcome the low reproducibility and translation of pre-clinical single center studies preclinical randomized controlled multicenter trials (pRCT) were proposed. Aim of the current study is to test the efficiency of an anti-IL-17A antibody treatment in a preclinical randomized controlled multicenter stroke trial (pRCT).

Our protocol fulfills fundamental requirements of pRCTs:

- harmonization of experimental protocols among study centers
- a priori sample size calculation
- randomization of the treatment groups
- blinding of all investigators with respect to treatment allocation
- centralized study organization
- analysis by an independent research center

2.1. Material provided by Hamburg:

- anti-IL-17A antibody (aliquots a 500µg (3.33 µg/µl), Clone MM17F3; 16.6 mg/kg of bodyweight)

- isotype-control antibody (IgG1) (aliquots a 500µg (3.33 µg/µl), 16.6 mg/kg of bodyweight)

- filament (see below)

3. Standardized MCAO procedure:

see: study design in Figure 2

3.1. Randomization:

Anti-IL-17A antibody and IgG control will be blinded and coded in Hamburg and distributed to each study center.
Antibody treatment, tMCAO, analysis of infarct volume, and secondary outcome parameters will be performed by researchers who are blinded with respect to the treatment groups. Unblinding will be performed after complement of the statistical analyses.

3.2. Power analysis

Power analysis on the basis of previously published effects of an anti-IL-17A treatment in comparison to an isotype ab treatment results in:

t tests - Means: Wilcoxon-Mann-Whitney test (two groups)

Analysis:	A priori: Compute required sample size	
Input:	Tail(s)	= One
	Parent distribution	= Normal
	Effect size d	= 1,2
	α err prob	= 0,05
	Power (1-β err prob)	= 0,95
	Allocation ratio N2/N1	= 1
Output:	Noncentrality parameter δ	= 3,42
	Critical t	= 1,69
	Df	= 30,48
	Sample size group 1	**= 17**
	Sample size group 2	**= 17**
	Total sample size	= 34
	Actual power	= 0,9551119

3.3. Animals:

- C57Bl/6 mice
- males
- age 11-13 weeks
- weight 24-28 g
- strokes should be performed between 8.00 a.m. and 16.00 a.m.

3.4. anti-IL-17A or IgG control administration:

- 500 µg / animal
- concentration 500µg in 150 µl
- 1h after reperfusion
- intravenous administration: retro-orbital or tail-vein
- **group size:** **- anti-IL-17A** **17 animals**
  - IgG control **17 animals**

3.5. MCAO-procedure:

3.5.1 filament:

- Silicon rubber-coated monofilament for MCAO model.

- Filament size 6-0, diameter 0.09-0.11 mm, length 20 mm; diameter with coating 0.21 +/- 0.02 mm, and coating length 1.5-2 mm. Pack of 10 filaments. Doccol filaments: 6-0- fine MCAO suture L12PK10 (# 602112PK10)

- Filament will be provided by Hamburg

- Filaments can be re-used if not damaged

3.5.2. occlusion of the left MCA

3.5.3. Occlusion time
- 45 min

3.5.4. Temperature control of mice during surgery
- 35.5-36.5°C

3.5.5. Daily measurement of bodyweight

3.6. Monitoring during MCAO (before removal of the filament)

3.6.1. If possible - physiological parameters:
- oxygenation
- heart rate
- breathing frequency

3.6.2. in every mouse laser doppler:
- Flow contralateral / Ipsilateral (before removal of the filament)
- only mice are included with a reduction of the laser doppler flow on the ipsilateral side ≥ 80% in comparison to the contralateral side

4. Neurological Scoring:

4.1. Bederson Score

- 3h post MCAO
- 1d post MCAO
- 3d post MCAO

5. Collection of brain on day 3 post MCAO:

Mice will be scarified on day 3

5.1. - mice will be perfused with
  - 25 ml PBS, 10 ml/ min, 4°C
  - 25 ml PFA, 10 ml/ min, 4°C
  - 24 h post fix in 4 % PFA in PBS, 4°C
  - transfer of brains into PBS, 4°C

5.2. Cooled brains will be sent to HH

6. Read out parameter

6.1. primary read out parameter:

infarct volumes on day 3 post MCAO will performed by

diffusion weighted MRI (apparent diffusion coefficient (ADC) in Hamburg (**see Fig. 1**)

6.2. secondary outcome parameter

6.2.1. mortality

6.2.2. neurological scores

6.2.3. histological analysis of the neutrophil infiltration in ipsilesional hemispheres

7 Exclusion criteria for analysis of the primary read out parameter

7.1 preanalytical exclusion criteria

7.1.1. Death before reaching the primary endpoint

7.1.2. Body temperature outside the accepted range

7.1.3. reduction of the laser doppler flow on the ipsilateral side < 80% in comparison to the contralateral side

7.2 analytical exclusion criteria

7.2.1 Significant destruction of the brain after removal

7.2.2 Visible parenchymal or subarachnoid hemorrhage

7.2.4. No visible infarct on the MRI

7.2.4 Isolated infarct of the brainstem

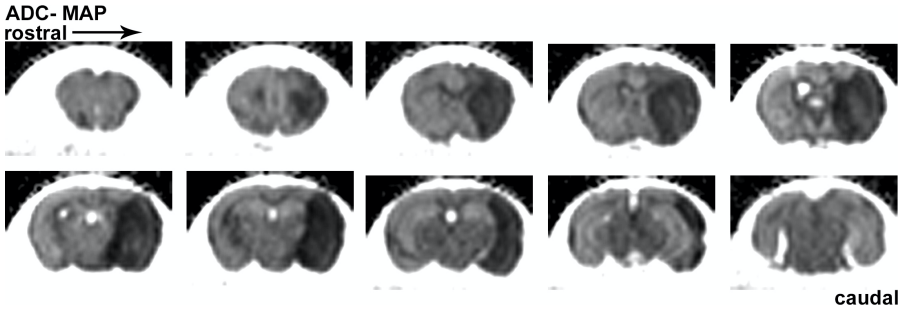

Figure 1: Example of infarct size analysis by MRI (DWI) of brains fixed with 4% PFA d3 following tMCAO

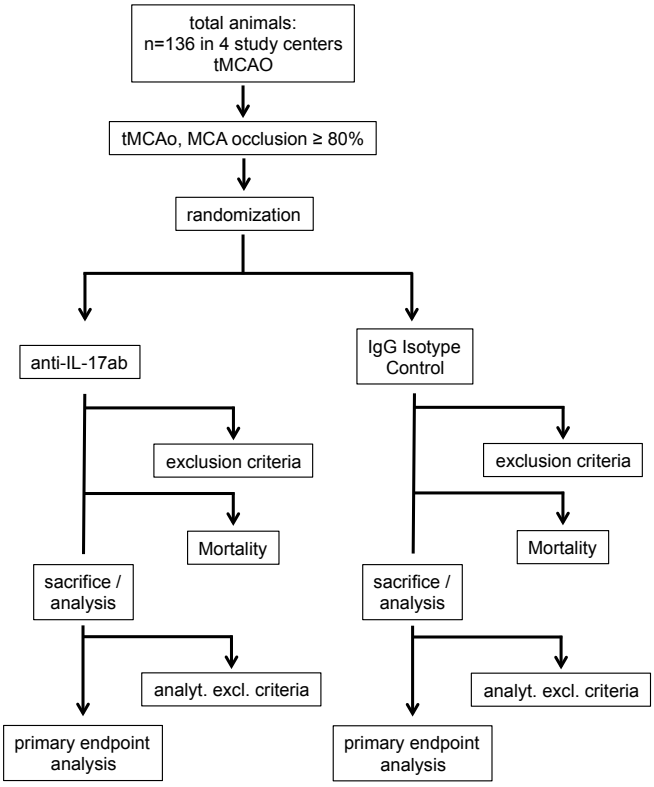

Figure 2: Design of the preclinical randomized controlled multicenter trial

Literature:

1. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltat cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med*. 2009;15:946-950
2. Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, et al. Neutralization of the il-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood*. 2012;120:3793-3802
3. Benakis C, Brea D, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal gammadelta t cells. *Nat Med*. 2016