

Doktorarbeit

**Mechanisms of tissue damage and repair in
ischemic brain injury –
potential biomarkers in ischemic stroke**

eingereicht von

Thomas Pekar, MA

Geb.Dat.: 22.12.1983

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der medizinischen Wissenschaft

(Dr. sci. med.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Neurologie

unter der Anleitung von

PD Dr. Thomas Seifert-Held

2012

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 28. Juli 2012

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Th. Seifert-Held', written in a cursive style.

Betreuer: Priv.-Doz. Dr. med. univ. Thomas Seifert-Held
Universitätsklinik für Neurologie, Graz

Ko-Betreuer: Prim. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Christian Lampl
Konventhospital der Barmherzigen Brüder, Linz

Univ.-Doz. Dipl. Ing. Dr. Stefan Ropele
Universitätsklinik für Neurologie Graz

Danksagung

Ich bedanke mich...

... bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Seifert-Held,
Herrn Prim. Priv.-Doz. Dr. Christian Lampl und
Herrn Univ.-Doz. Dipl. Ing. Dr. Stefan Ropele
für die Betreuung meiner Arbeit.

... bei Frau Ass. Prof. Priv.-Doz. Dr. Tatjana Stojakovic
für Ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

... bei Herrn ao. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Schreibmayer
für die Betreuung in der Doktoratsschule TMCB.

... beim gesamten Team des Neurologie-Labors
für die fortlaufende Unterstützung.

... bei meinen Eltern für Ihre Unterstützung.

... bei Sabine für ihre Unterstützung Geduld und Nachsicht.

... **vor allem aber bei ao. Univ.-Prof. Dr. Maria Storch**
für die Impulsgebung und Ermöglichung des Studiums!

DANKE!

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Abbildungsverzeichnis	3
3	Tabellenverzeichnis	4
4	Zusammenfassung	5
5	Abstract	7
6	Einleitung	8
6.1	Ziel	10
7	Theoretische Grundlagen	11
7.1	Allgemeine und zelluläre Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls	11
7.1.1	Exzitotoxizität	13
7.1.2	Entzündungsreaktion	15
7.1.3	Apoptose	17
7.2	Dkk-1	19
7.3	IL-6	20
7.4	MMP-9	22
7.5	MRP8/14	23
7.6	Neutrophile Elastase	24
7.7	NGAL	25
7.8	PRDX-1	26
9	Material und Methoden	28
9.1	Patienten	28
9.2	Klinik und Labor	30
9.3	Serologische Bestimmung der Analytkonzentrationen	34
9.4	Tiermodell	35
9.5	Färbung und Immunhistochemie	37
9.5.1	Protokoll Hämalaun und Eosin Färbung	39
9.5.2	Protokoll IHC	39
9.5.3	Protokoll Doppel-IHC	40
9.5.4	Protokoll SIS	40
9.5.5	Reagenzien und Lösungen	41

9.5.6	<i>Histologische Auswertung</i>	43
9.6	Statistische Auswertung	44
10	Ergebnisse	45
10.1	Serologie Tag 0	45
10.1.1	<i>DKK-1</i>	48
10.1.2	<i>MRP8/14</i>	50
10.1.3	<i>PRDX-1</i>	52
10.2	Serologie Tag 7	53
10.3	Tiermodell	64
10.3.1	<i>PRDX-1</i>	65
11	Diskussion	70
11.1	Serologie Tag 0	70
11.2	Serologie Tag 7	72
11.3	Tiermodell	74
12	Literatur	77
13	Curriculum Vitae	102
14	Anhang	105

1 Abkürzungsverzeichnis

ASK-1	Apoptose-Signal-Regulierende Kinase 1
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CAM	Cell Adhesion Molecule
CCS	Causative Classification of Stroke System
CI	Konfidenzintervall
CRP	C-Reaktives Protein
CT	Computertomographie
DKK-1	Dickkopf Protein 1
ECL	Elektro-Chemi-Lumineszenz
eGFR	geschätzte Glomeruläre Filtrationsrate
ELA2	Elastase 2
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
H&E	Hämalaun und Eosin
ICA	Arteria carotis interna
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IQR	Interquartilsabstand
LACS	lacunar syndrome
MAP-2	Mikrotubulus assoziiertes Protein 2
MCA	Arteria cerebri media
MCAO	Occlusion der Arteria cerebri media
MRP8/14	Myelin Related Protein 8/14
mRS	modifizierte Rankin Skala
MW	arithmetisches Mittel
n	Anzahl
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OCSP	Oxfordshire Community Stroke Project
OR	Odds Ratio

p	Wahrscheinlichkeitsmaß
PACS	partial anterior circulation syndrome
pag	Proliferation-assoziiertes-Gen
POCS	posterior circulation syndrome
Prdx	Peroxiredoxin
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
r	Korrelationskoeffizient
ROC	Receiver Operator Characteristic
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
r_s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
SD	Standardabweichung
SIS	Silber Infarkt Färbung
TACS	total anterior circulation syndrome
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
WNT	Wg und Int-1
ZNS	Zentralnervensystem

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Putative Kaskade von Ereignissen in der fokalen zerebralen Ischämie; adaptiert nach(Dirnagl et al., 1999).....	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entzündungsreaktion nach ischämischen Schlaganfall (aus: Ceulemans et al., 2010).....	15
Abbildung 3: Lokalisation und Häufigkeit der OCSP Klassen; aus (Fluri and Lyrrer, 2008).....	32
Abbildung 4: Schematische Darstellung der ABC-Methode; adaptiert nach (Noll et al., 2000).....	37
Abbildung 5: Studien Flow Chart für Serologie Tag 0.....	46
Abbildung 6: Dkk-1 Spiegel im Plasma.....	49
Abbildung 7: MRP8/14 Spiegel im Plasma.....	51
Abbildung 8: Studien Flow Chart für Serologie Tag 7.....	53
Abbildung 9: ROC-Kurven von Vorhersagemodell 1 & 2.....	62
Abbildung 10: Map2 und Mac3 IHC Immunreaktivität im Zeitverlauf.....	65
Abbildung 11: PRDX-1 Expression im Zeitverlauf (mittlere Reihe: Hirnquerschnitte mit Map-2 IHC; linke Seite: vergrößerte Ausschnitte der ischämischen Regionen; rechte Seite: vergrößerte Ausschnitte der kontra-lateralen Bereiche).....	66
Abbildung 12: PRDX-1 positive Zellen im Zeitverlauf nach MCAO.....	67
Abbildung 13: PRDX-1 und Mac3 Doppelmarkierung (A: PRDX-1 = braun, Mac3 = grün; B: Mac3; C: PRDX-1; D: B&C übereinandergelegt – gelb: Ko-Lokalisation) (Vergrößerung: A = 630fach; B-D = 1000fach).....	68
Abbildung 14: PRDX-1 und Olig-2 Doppelmarkierung (A: PRDX-1 = grün, Olig-2 = grün; B: Olig-2; C: PRDX-1; D: B&C übereinandergelegt – gelb: Ko-Lokalisation) (Vergrößerung: A = 1000fach; B-D = 630fach).....	69

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: modifizierte Rankin Skala nach (van Swieten et al., 1988)	31
Tabelle 2: verwendete ELISA Kits	34
Tabelle 3: Protokoll Zitadelle	36
Tabelle 4: verwendete Antikörper	38
Tabelle 5: Demographische Daten, Klinik und Medikation der Patientenkohorten	47
Tabelle 6: Demographische Daten und klinische Charakteristika der Patienten des zweiten Studienteils.....	55
Tabelle 7: Proteinkonzentration und deren Korrelation mit dem Outcome	57
Tabelle 8: Proteinspiegel im peripheren Blut eingeteilt nach dem Auftreten von Infektionen.....	59
Tabelle 9: Vorhersagemodelle 1 & 2	61
Tabelle 10: Vorhersagemodelle 3 & 4	63
Tabelle 11: PRDX-1 positive Zellen im Zeitverlauf nach MCAO	67

4 Zusammenfassung

Der akute ischämische Insult ist eine der führenden Ursachen für bleibende Behinderung und Tod und verursacht enorme Ausgaben für das Gesundheitssystem. Die bisherigen Therapieoptionen beschränken sich weitestgehend auf die Fibrinolyse. Die Effektivität dieser Behandlung ist allerdings durch ihr enges Zeitfenster und ihre hohe Komplikationsrate limitiert. Daher ist die Suche nach weiteren therapeutischen Ansatzpunkten von großer Bedeutung.

Aktuell sind keine Marker im peripheren Blutkreislauf bekannt, welche die Outcome-Vorhersage nach einem ischämischen Schlaganfall von validierten klinischen Modellen verstärken können. Der ischämische Schlaganfall wird von zellulären und hormonellen Veränderungen im peripheren Blut begleitet. In dieser Arbeit wurden die Mechanismen der Gewebsschädigung und Reparatur nach ischämischem Schlaganfall hinsichtlich potentieller Biomarker untersucht. Es war möglich folgende sieben Proteine, die in Zusammenhang mit Entzündungsreaktion, Leukozyten- und Thrombozyten-Funktion stehen, für weitere Untersuchungen auszuwählen: Dkk-1, IL-6, MMP-9, MRP8/14, Neutrophile Elastase, NGAL und PRDX-1. Diese wurden im peripheren Blut auf ihren Zusammenhang mit dem Schweregrad des Insults und ihrer Eignung zur Vorhersage des klinischen Outcomes nach ischämischem Schlaganfall getestet. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte mittels ELISA-Kits.

Die Ergebnisse zeigten erhöhte zirkulierende Konzentrationen von Dkk-1 bei Patienten, die einen Schlaganfall erlitten haben. Darüber hinaus waren die gemessenen Dkk-1 Spiegel in der akuten Phase im Vergleich zu Patienten mit einer stabilen zerebrovaskulären Erkrankung und gesunden Kontrollen signifikant erhöht.

Die gemessenen Plasma Konzentrationen von NGAL zeigten eine signifikante Korrelation mit der mRS am Tag 90. Außerdem zeigte das Hinzufügen der NGAL-Werte zu klinischen Variablen eine signifikante Erhöhung der Fläche unter der Receiver Operating Characteristics Kurve.

Von PRDX-1 konnten keine detektierbaren Werte im Patientenblut gefunden werden. Deshalb ist das Fadenmodell der Maus, welches das am häufigsten verwendete Tiermodell in der Schlaganfallforschung ist, zur Untersuchung der

Quellen für PRDX-1 nach einem Insult zur Anwendung gekommen. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten eine signifikante Erhöhung von PRDX-1 in der durch Ischämie geschädigten Region ab Tag 7 nach MCAO. Darüber hinaus wurde eine Immunreaktivität für PRDX-1 von Oligodendrozyten und Makrophagen gefunden. Somit kann von einem intrazellulären Ursprung von PRDX-1 ausgegangen werden.

5 Abstract

Ischemic stroke is among the leading causes of death and disability and utilises a considerable amount of health care expenses. Immediate fibrinolysis of occluded brain vessels can improve the patients' outcome. However, recanalisation therapies are time dependent and therefore are only applicable to a minor proportion of patients. So interventions to improve outcome are urgently needed. Currently, there are no markers in peripheral blood which could add predictive power to a validated clinical model for predicting prognosis in patients with acute ischemic stroke. Ischemic stroke is accompanied by cellular and humoral changes in peripheral blood. In the current study, mechanisms of tissue damage and repair after ischemic stroke were examined for finding potential biomarkers. It was possible to select the following seven proteins for further investigations: Dkk-1, IL-6, MMP-9, MRP8/14, neutrophil elastase, NGAL and PRDX-1. Afterwards the selected mediators in peripheral blood which are related to inflammation, leukocyte and thrombocyte function were evaluated to obtain information about their role in predicting the clinical outcome following ischemic stroke. This was done by ELISA.

It was possible to show increased circulating levels of Dkk-1 in peripheral blood in patients with strokes. Furthermore the levels of Dkk-1 in the acute phase were significantly increased in comparison to patients with stable cerebrovascular diseases and healthy controls.

The measured plasma levels of NGAL showed a significant correlation with the mRS at day 90. In predictive models for the outcome after a stroke, the addition of NGAL to clinical variables significantly increased the area under receiver operating characteristics curves.

There were found no detectable values of PRDX-1 in patient's blood. Therefore the mouse filamentmodel, which is the most used animal model in stroke research, was used for the investigation of the sources of PRDX-1.

Immunohistochemical staining showed a significant increase of PRDX-1 in the area which was damaged by ischemia from day 7 post MCAO on. Furthermore it was found an immunoreactivity for PRDX-1 on oligodendrocytes and macrophages. Thus the origin of PRDX-1 can be assumed intracellular.

6 Einleitung

Alle 6 Minuten erleidet ein Österreicher einen Schlaganfall; das sind 200.000 Ereignisse pro Jahr. (OEGSF, 2010) Global betrachtet ist es die dritthäufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern. (Bajaj et al., 2010) In Österreich wurden 2010 43% der Todesfälle durch Herz-Kreislauf Erkrankungen, zu denen auch der Schlaganfall gezählt wird, verursacht. (Leitner, 2011) Die am häufigsten auftretende Form des Schlaganfalls ist die ischämische. (Reiche, 2003)

In den USA verursachten Schlaganfälle im Jahr 2008 Kosten in der Höhe von 34,3 Milliarden Dollar. Etwas mehr als die Hälfte der Ausgaben, 18,8 Milliarden Dollar, fielen davon für die direkte medizinische Versorgung an. (Roger et al., 2012) Der verbleibende Löwenanteil der Kosten wurde durch indirekte Kosten wie Pflege, Berufsunfähigkeiten und weiteren verursacht. In Österreich wurden die direkten Kosten eines Schlaganfalls auf 30.000 – 60.000 Euro geschätzt. (Brainin et al., 2003)

Zur Behandlung des ischämischen Schlaganfalls stehen vier wirksame Maßnahmen zur Verfügung: die Versorgung auf einer spezialisierten Einheit mit Akutbehandlung und Frührehabilitation, die systemische Thrombolyse, die Gabe von Acetylsalicylsäure (ASS) und die Dekompression mittels Kraniotomie bei einem raumfordernden Infarkt. (Lang, 2009) Dabei spielt die Zeit zwischen Insult und Therapiebeginn vor allem bei der Thrombolyse eine wichtige Rolle für die Wirksamkeit der Behandlung. (Hacke et al., 2004) Für die Entscheidung, ob eine Thrombolyse zur Anwendung kommt, ist eine Bildgebung mittels CT von Nöten. (Wildermuth et al., 1998) Deshalb gibt es die Idee einer mobilen Schlaganfalleinheit, in Form eines in einem Krankenwagen installierten CT-Gerätes. Erste Versuche zeigten, dass sich damit das Zeitfenster zwischen Infarkt, Diagnose und Lysetherapie halbieren lässt. (Walter et al., 2012)

Außerdem wäre es wichtig einen Marker für die Vorhersage der Größe und der Lokalisation des Infarktes zu haben, um eine passende Chancen-Risiko Abschätzung treffen zu können. (Tarkowski et al., 1995)

Somit kristallisieren sich drei Hauptpunkte heraus, die im Fokus der Forschung liegen:

1. Die eindeutige Diagnosestellung
2. Die optimale Therapie
3. Die Vorhersage über den Outcome des Patienten, um eine optimale weiterführende Versorgung der Patienten planen zu können.

An dieser Stelle kommen die Biomarker ins Spiel.

„Biomarker sind messbare biochemische oder molekulare Größen, die einen physiologischen oder pathologischen Prozess oder die Antwort auf eine therapeutische Intervention beschreiben.“ Biomarkers Working Group 2001

Aufgrund der Komplexität der Thematik beschäftigt sich diese Arbeit nur mit potentiellen Markern, die im Blut (Serum oder Plasma) nachgewiesen werden können.

In der jüngeren Vergangenheit sind eine ganze Reihe von Biomarkern zu ihrer Bedeutung bei zerebrovaskulären Erkrankungen mit Fokus auf Diagnose, Differenzierung und Prognoseabschätzung untersucht worden. (Sitzer et al., 2007)

Trotz zahlreicher Studien konnte noch kein geeigneter Biomarker identifiziert werden, der für den Einsatz in der klinischen Routine empfohlen werden kann. (Whiteley et al., 2008) Darüber hinaus konnte keine der Studien aufzeigen, dass der darin getestete Biomarker zusätzliche Vorhersagekraft zu einem validierten klinischen Modell liefern kann. (Whiteley et al., 2009)

Daher ist die Suche nach weiteren diagnostischen, therapeutischen und prognostischen Ansatzpunkten von großer Bedeutung. Dabei sind insbesondere inflammatorische Mechanismen als auch die nach Schlaganfall auftretende neuroendokrine Aktivierung von Interesse.

6.1 Ziel

Das mit dieser Dissertation verfolgte Ziel ist, zur Erweiterung der Erkenntnisse degenerativer und regenerativer Prozesse bei ischämischer ZNS Schädigung beizutragen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sollen zu einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge in der Akutsituation der zerebralen Ischämie beitragen als auch die Charakterisierung möglicher prognostischer Parameter im peripheren Blut für den Langzeitverlauf nach zerebralem ischämischen Insult ermöglichen.

7 Theoretische Grundlagen

7.1 Allgemeine und zelluläre Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls

Ein ischämischer Schlaganfall entsteht durch eine vorübergehende oder permanente Verringerung des Blutflusses einer zerebralen Arterie. In den meisten Fällen liegt dem verringerten Blutfluss ein Verschluss der Hirnarterie, verursacht durch eine lokale Thrombose oder einen Embolus, zugrunde. (Dirnagl et al., 1999) Im Gegensatz dazu kommt es beim hämorrhagischen Schlaganfall zu einer Einblutung aus einem Gefäß. (Gorbacheva and Natiashkina, 1983) Bei Menschen tritt der ischämische Infarkt am häufigsten im Bereich, der von der Arteria cerebri media versorgt wird, auf. (Mhairi Macrae, 1992)

Das Ausmass und die Folgen des ischämischen Schlaganfalls hängen von zahlreichen biochemischen und physiologischen Vorgängen ab. Diese sind sowohl die Dauer und der Schweregrad der Durchblutungsstörung als auch das Ausmaß der Reperfusion im Randbereich des Infarktes. (Siesjo and Bengtsson, 1989)

Das durchblutungsgestörte Areal besteht aus mehreren Zonen. Im Zentrum befindet sich der Kern in dem schon innerhalb weniger Minuten nach dem Beginn der Unterversorgung eine dauerhafte Depolarisation der Zellen stattfindet und sich bereits in der ersten Stunde infarziertes Gewebe histologisch identifizieren lässt. (Touho and Karasawa, 1996) Der Kern ist umgeben von der Penumbra. Dies ist ein Gebiet, in dem der Funktionsstoffwechsel des Gewebes eingeschränkt oder erloschen ist. Der Erhaltungsstoffwechsel und die Membranfunktionen sind in diesem Bereich aber noch intakt. (Astrup et al., 1981) Zellen in dieser Zone können überleben und ihre normale neurologische Funktion wieder aufnehmen, wenn innerhalb eines gewissen Zeitfensters der zerebrale Blutfluss wieder hergestellt wird. (Touho and Karasawa, 1996)

Dirnagl et al. haben gezeigt, dass ischämische Vorfälle im Hirn aus komplexen pathophysiologischen Vorgängen resultieren. Diese inkludieren Exzitotoxizität, Depolarisationen im umgebenden Bereich, Entzündungen und den programmierten Zelltod. Im zeitlichen Verlauf gesehen bedeutet dies folgendes: bereits wenige Minuten nach dem Ausbleiben der Durchblutung können

exzitotoxische Mechanismen Neuronen und Gliazellen zerstören. Außerdem werden durch diesen Prozess Folgemechanismen, die zu einer weiteren Gewebsschädigung beitragen, ausgelöst. Dabei handelt es sich um die Depolarisation im peri-Infarkt Bereich und die zeitlich verzögert beginnenden Entzündungsreaktionen und Apoptosevorgänge. (siehe Abbildung 1) (Dirnagl et al., 1999)

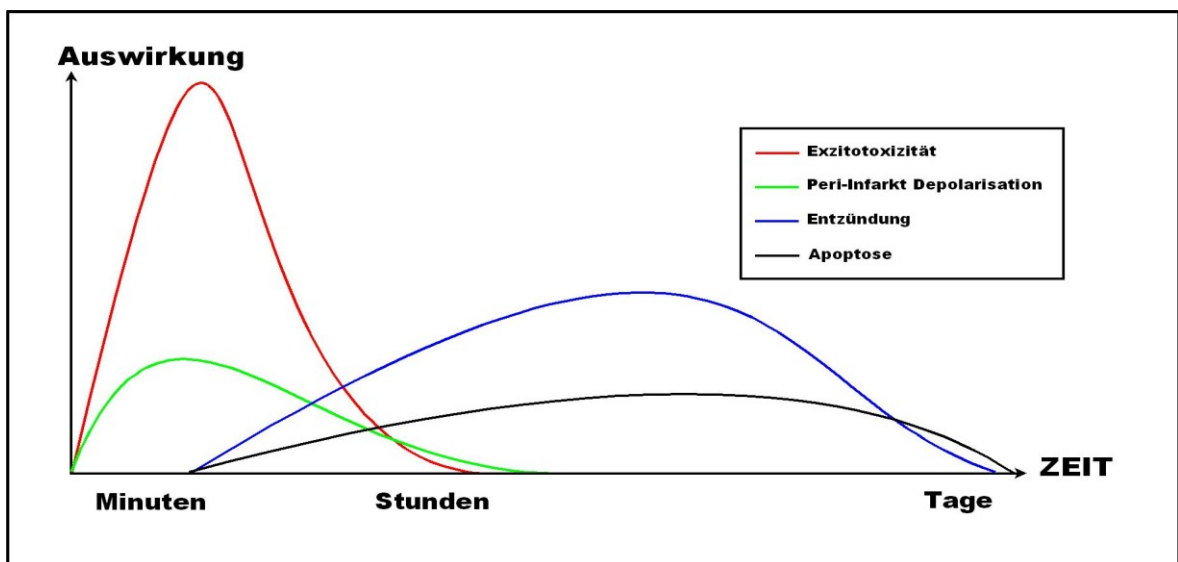


Abbildung 1: Putative Kaskade von Ereignissen in der fokalen zerebralen Ischämie; adaptiert nach(Dirnagl et al., 1999)

7.1.1 Exzitotoxizität

Nach dem Infarkt kommt es zu einem starken Anstieg von extrazellulärem Glutamat im Hirn und eine Überstimulierung von NMDA-Rezeptoren führt zu einem signifikanten Anteil von Ischämie bedingter Hirnschädigung. Kurz nach der Ischämie wird durch das Ausbleiben des cerebralen Blutflusses der Sauerstoff- und Glukosegehalt dezimiert. (Allen and Bayraktutan, 2009) Diese glutaminerge Erregung wird auch Exzitotoxizität genannt. (Lipton and Rosenberg, 1994) Dies resultiert in einer ausbleibenden ATP Produktion. Die unzureichende Versorgung mit ATP verursacht in weiterer Folge eine Fehlfunktion der ATP-abhängigen Ionenpumpen und es kommt zu einer Änderung des Ionen-Konzentrations-Gradienten auf den Nervenzell- und Gliazellmembranen. (Katsura et al., 1994) Dadurch kommt es zu einer spannungsabhängigen Aktivierung der Kalziumkanäle und exzitatorische Aminosäuren werden in den extrazellulären Raum freigegeben. (Dirnagl et al., 1999) Dies verursacht einen weiteren Anstieg der Glutamatkonzentration im extrazellulären Raum und es kommt zu einer Überstimulierung der NMDA-Rezeptoren. Dies resultiert in weiterer Folge im Einströmen von Kalzium in toxischen Konzentrationen. (Nehls et al., 1990) Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der Kalzium vermittelten intrazellulären Abbauenzyme und die Ereigniskaskade endet in einem Versagen der Mitochondrien, der Produktion von ROS (Reaktive Sauerstoffspezies), Entzündungsreaktionen, Zellnekrose und Apoptose. (Deb et al., 2010) Dabei führen die freigesetzten ROS zu einer Überforderung der endogenen Schutzmechanismen und es kann eine DNA-Schädigung nicht verhindert werden. (Sies and Mehlhorn, 1986) Darüber hinaus beschädigen diese freien Radikale die Membrane mittels Lipolyse was zu einer Aktivierung der Mikroglia führt. Das hat die Einwanderung von Entzündungszellen via Aufregulierung von endothelialen Adhäsionsmolekülen zur Folge. (Dirnagl et al., 1999)

Hirnzellen, welche einer exzessiven Glutamatrezeptor-Aktivierung oder einem Überschuss an Kalzium ausgesetzt sind, können zugrunde gehen. Ob dies via Nekrose oder Apoptose passiert, hängt vom Stimulus, dem Typ, dem erreichten Stadium im Lebenszyklus oder dem Differenzierungsgrad der Zelle ab. (Leist and Nicotera, 1998) Das Auftreten von Apoptose startet zeitgleich mit der Entzündungsreaktion; wobei der verzögerte Zelltod vermehrt in der Penumbra

stattfindet und sich das schnelle Zugrundegehen von Nerven- und Gliazellen im Kern ereignet. (Mergenthaler et al., 2004)

Ein Signalweg, der an den Apoptose-Vorgängen beteiligt ist, ist der Wnt-Signalweg. (Hu et al., 2011) Seine Hauptrolle wird aber bis dato in der Embryogenese (Sidow, 1992), der Neurogenese (Miranda et al., 2012) und im Krebszellwachstum (Cui et al., 2012, Veeck and Dahl, 2012) gesehen.

Aufgrund der Beteiligung des Wnt-Signalweges an den postischämischen Vorgängen wurde dieser Prozess für die Suche nach einem Biomarker herangezogen. Im Zuge dieser Dissertation wird das als Antagonist des Wnt-Signalweges beschriebene Dickkopf-1 Protein (Dkk-1) (Chamorro et al., 2005, Gonzalez-Sancho et al., 2005, Niida et al., 2004) und NGAL (Neutrophiles Gelatinase assoziiertes Lipicalin), welches ebenfalls mit dem Wnt-Signalweg (Ziegler et al., 2007) und außerdem noch in kausalem Zusammenhang mit Apoptose (Devireddy et al., 2005, Devireddy et al., 2001) stehen soll, genauer untersucht. Auch Dkk-1 soll zum Zelltod nach Ischämie beitragen. (Mastroiacovo et al., 2009)

7.1.2 Entzündungsreaktion

Durch zuvor beschriebenen Vorgang wird auch die Expression von Genen, welche post-ischämische Entzündungsreaktionen starten, ausgelöst. (Dirnagl et al., 1999) Diese Reaktionen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des ischämischen Schlaganfalls. (Jin et al., 2010) Sie werden sogar als Hauptursache für Morbidität und Mortalität von Patienten mit akuter Schädigung des ZNS gesehen und werden auch als CIDS (CNS-injury-induced-immuno-deficiency-Syndrom) (Meisel et al., 2005) bzw. nur auf den Schlaganfall bezogen Schlaganfall-induzierte Immundepression (Dirnagl et al., 2007) bezeichnet.

Es gibt Beweise, dass post-ischämische Entzündungen die ischämischen Schädigungen verstärkt. (Feuerstein et al., 1998) Nachfolgende Darstellung (siehe Abbildung 2) zeigt einen schematischen Überblick der nach einem ischämischen Schlaganfall ablaufenden Entzündungsreaktion.

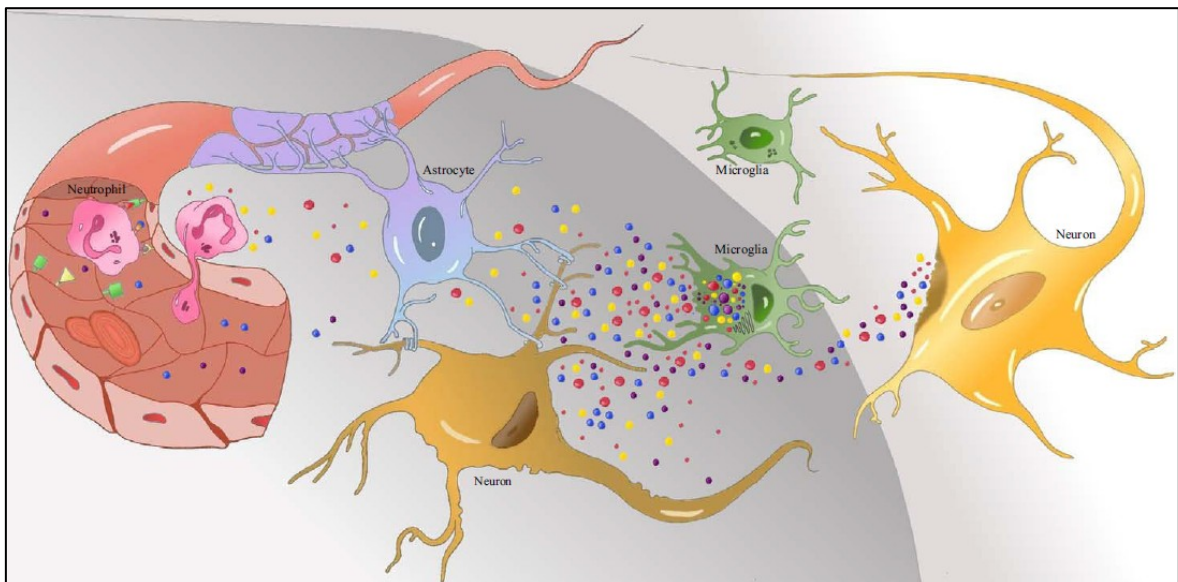


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entzündungsreaktion nach ischämischem Schlaganfall (aus: Ceulemans et al., 2010)

Zuerst kommt es zu einer Aktivierung der Mikroglia-Zellen als Antwort auf die Schädigung im Gehirn. Diese beginnen darauf eine Fülle von proinflammatorischen Mediatoren zu produzieren. Dazu zählen, neben anderen, IL-1 β und TNF- β . (Nakajima and Kohsaka, 2001) Diese können einerseits zu einer Vergrößerung des Gewebeschadens beitragen (Barone et al., 1997, Rothwell et al., 1997) und andererseits das Gehirn vor Exzitotoxizität schützen. (Raivich et al.,

1999, Hallenbeck, 2002) Als ein Stimulator der Sekretion von inflammatorischen Cytokinen wird Peroxiredoxin 1 (PRDX-1) beschrieben. (Riddell et al., 2010)

Die aktivierte Mikroglia ist auch eine Hauptquelle für IL-6 (Amantea et al., 2009), auf welches in einem späteren Kapitel dieser Arbeit noch genauer eingegangen wird.

Die Proliferation der Mikroglia erreicht ihren Höhepunkt 48-72 Stunden nach der Ischämie und dauert einige Wochen an. (Lalancette-Hebert et al., 2007) Im Gegensatz dazu gelangen die Leukozyten aus dem Blutkreislauf erst mit einer Verzögerung von einigen Stunden bis einigen Tagen in das Hirngewebe. (Schilling et al., 2003) Dem Übergang der Immunzellen aus dem Blutkreislauf gehen jedoch einige andere Vorgänge voraus: Neben der Mikroglia werden auch die Astrozyten aktiviert. Diese produzieren neurotoxische und neurotrophische Faktoren, welche die Neuronen durch Nekrose zerstören lässt. Dies führt wiederum zu einer verstärkten Aktivierung der Gliazellen. Die Ausläufer der Astrozyten binden an das Endothel der Gefäße. Proinflammatorische Cytokine gelangen so in die Blutgefäße und bewirken eine Anlagerung der neutrophilen Granulozyten an die Endothelwand. Durch die Bindung von Selektinen mit Sialyl-Lewis-x und CAMs (Zelladhäsionsmolekülen) mit Integrinen kommt es bei den Granulozyten zu einer morphologischen Veränderung. Aufgrund dieser ist es ihnen nun möglich das Endothel zu passieren und durch den Einfluss von Chemokinen in das ischämische Gewebe zu migrieren. Dort verursachen sie dann eine zweite Gewebsschädigung von potentiell überlebensfähigem Gewebe durch die Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen und anderen toxischen Substanzen (Proteasen, ROS, MMPs und andere). Ausserdem werden von den Granulozyten proteolytische Enzyme freigesetzt, welche die Endothelzellen zerstören und dadurch die Permeabilität der Bluthirnschranke erhöhen. Diese Veränderung fördert auch das Auftreten von post-ischämischen Ödemen. (Huang et al., 2006, Ceulemans et al., 2010, Pantoni et al., 1998) Auch bei diesen Vorgängen soll das zuvor erwähnte PRDX-1 beteiligt sein, indem es die Endothelzellen vor dem ROS induzierten Zelltod schützt, und so eine Anlagerung und Migration der Leukozyten reduziert. (Schreibelt et al., 2008) Außerdem wird auch der Matrix-Metalloproteinase-9 eine Beteiligung an der Schädigung der Bluthirnschranke und der Entzündungsreaktion als Antwort auf den Schlaganfall zugeschrieben. (Gu et al., 2002, Svedin et al., 2007)

Die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten findet bereits 30 Minuten nach dem Infarkt statt. (Yilmaz and Granger, 2008) Die genaue Rolle der Zellen in der Pathogenese des ischämischen Schlaganfalls ist noch Gegenstand der Forschung. (Jin et al., 2010)

T-Lymphozyten hingegen infiltrieren erst 3-4 Tage nach dem Infarkt das ischämische Gewebe (Stevens et al., 2002) und sollen in Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen, Gewebsschädigungen und neurologischen Defiziten stehen. (Yilmaz et al., 2006)

7.1.3 Apoptose

Dirnagl et al. stellen die Frage, ob es sich bei Apoptose um Selbstmord in der Penumbra handelt. Laut den Autoren findet im Infarktkern vor allem Nekrose und die Apoptose in der Penumbra statt. (Dirnagl et al., 1999) Der Begriff Apoptose wurde erstmals 1972 beschrieben und es handelt sich dabei um einen kontrollierten Zelltod. (Kerr et al., 1972) Dieser geplante Untergang hat den Vorteil gegenüber der Nekrose, dass Phagozyten oder benachbarte Zellen Inhalte und Bestandteile aufnehmen können und so eine Entzündungsreaktion verhindert werden kann. (Savill et al., 1993) Dies ist vor allem im Nervensystem wichtig, wo die Freisetzung von exzitatorischen Mediatoren, wie Glutamate, von zugrunde gehenden Zellen, schwere Folgeschäden an benachbarten Neuronen verursachen können. (Nicholls and Attwell, 1990)

Eine Schlüsselrolle an den apoptotischen Vorgängen haben die Mitochondrien, da diese mit einer Vielzahl an mit Apoptose assoziierten Proteinen in Zusammenhang stehen. (Green and Kroemer, 2004) Diese Proteine führen in weiterer Folge zum Start der Caspase-Kasade, (Thornberry and Lazebnik, 1998) in deren Ablauf es zur Freisetzung von Effektor-Caspasen kommt, welche aktiv am Abbau der Zellkernmembran und des Zytoskeletts beteiligt sind. Dies führt letztendlich dazu, dass sich die Zelle nach und nach in kleinen Vesikeln abschnürt. (Yuan and Yankner, 2000) Der Ablauf der Caspase-Kaskade wird dabei von rezeptor- und nicht rezeptorgesteuerten Mechanismen in Gang gesetzt. (Bergeron and Yuan, 1998)

Auch mit den Vorgängen der Apoptose konnte das bereits im Kapitel "Entzündungsreaktion" angesprochenen PRDX-1 in Zusammenhang gebracht

werden. Es wurden negative Korrelationen mit Apoptose bei verschiedenen Zelltypen gefunden. (Berggren et al., 2001, Guo et al., 2011, Kim et al., 2008, Park et al., 2012) Aufgrund dieser Tatsache hat sich auch dieses Protein als potentieller Biomarker für diese Studie qualifiziert.

7.2 Dkk-1

Die WNT Familie der Glykoproteine spielt eine Rolle in der Signaltransduktion während der Embryonalentwicklung und bei verschiedenen Erkrankungen. (Moon et al., 2004, Sidow, 1992)

In der Literatur häufen sich Berichte darüber, dass die Hemmung des WNT-Signalweges zur Pathophysiologie der neuronalen Schädigung bei akuten und chronischen neurodegenerativen Erkrankungen einen Beitrag leistet. (De Ferrari et al., 2003, Busceti et al., 2007, Scali et al., 2006, Cappuccio et al., 2005, Mastroiacovo et al., 2009)

Die WNTs binden an den 7-Transmembran Rzeptor, Frizzled und Ko-Rezeptoren, die LRP5 und LRP6 entsprechen. (Dale, 1998) Einer der Antagonisten des WNT Signalwegs ist die Dickkopf Familie. Diese besteht bei Wirbeltieren aus 4 Mitgliedern (Dkk-1/2/3/4). (Kawano and Kypta, 2003) Die vier Mitglieder beeinflussen hauptsächlich die kanonische und die β -Catenin Kaskade. (Niehrs, 2006) DKK-1 hat eine große Rolle während der Entwicklung und wird im adulten Gehirn nur in geringen Mengen expremiert. (Glinka et al., 1998, Diep et al., 2004) In früheren Studien wurde beschrieben, dass Dkk-1 eine Rolle in der Thrombozyten vermittelten endothelialen Aktivierung bei Erkrankungen der Arterien hat. (Perez Castrillon et al., 2010, Ueland et al., 2009) Es wurde auch Immunreaktivität und mRNA von Dkk-1 in Ablagerungen in den Karotiden bei Menschen gefunden. (Ueland et al., 2009) Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass Dkk-1 auch bei der Thrombozyten-Endothel Interaktion nach einem ischämischen Schlaganfall in den peripheren Blutkreislauf freigegeben wird. Die Hypothese, dass Dkk-1 beim Schlaganfall eine Rolle spielen sollte, lassen Daten von Tierversuchen vermuten, die eine Aufregulierung in den Neuronen in ischämischen Hirnregionen (Cappuccio et al., 2005, Mastroiacovo et al., 2009) und bei neurodegenerativen Modellen zeigen. (Rosi et al., 2010) Bei Alzheimer Patienten konnte eine Expression von Dkk-1 bei zugrunde gehenden Neuronen gefunden werden. (Caricasole et al., 2004)

7.3 IL-6

Interleukin-6 gehört neben TNF- α und Interleukin-1 β zu den am häufigsten vorkommenden proinflammatorischen Cytokinen nach einem Schlaganfall. (Ceulemans et al., 2010) Die Produktion von IL-6 wird durch IL-1 und / oder TNF- α , welche wichtige regulatorische Cytokine für die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren sind, stimuliert. Außerhalb des ZNS wird IL-6 vor allem von Fibroblasten, Endothelzellen und aktivierten T-Lymphozyten produziert. (Siegenthaler and Bluhm, 2006)

Die Hauptquellen für IL-6 im ZNS sind aktivierte Mikroglia, Gliazellen, Neuronen und eingewanderte Immunzellen. (Legos et al., 2000, Amantea et al., 2009) Bei den Gliazellen konnte jedoch nur bei den Astrozyten die Fähigkeit zur Produktion von IL-6 nachgewiesen werden. (Acarin et al., 2000)

IL-6 kann bereits 4 Stunden nach dem Schlaganfall gemessen werden und bleibt für ungefähr 14 Tage detektierbar. Die höchsten Konzentrationen werden einen Tag nach dem Infarkt erreicht. (Amantea et al., 2009, Kim, 1996, Nilupul Perera et al., 2006) Zu diesem Anstieg können sowohl die Ausschwemmung von zerebral gebildeten IL-6 als auch eine periphere Produktion, welche durch zerebrale Schädigung auch in lymphatischem Gewebe indiziert werden kann, beitragen. (Offner et al., 2006) Im Rattenhirn konnte eine erhöhte IL-6 Aktivität bereits zwei Stunden nach dem Verschluss der Karotis detektiert werden. Da das ischämische Gewebe jedoch 12 Stunden nach MCAO noch nicht massiv von Immunzellen infiltriert wird, muss von einer intrazerebralen Quelle für IL-6 ausgegangen werden. (Loddick et al., 1998)

Bei Schlaganfallpatienten wurde zudem eine höhere Blutkonzentration von IL-6 als bei gesunden Kontrollpersonen gefunden. (Tarkowski et al., 1995)

In anderen klinischen Studien konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Plasmakonzentrationen von IL-6 und dem Schweregrad des Insultes festgestellt werden. (Tuttolomondo et al., 2009, Orion et al., 2008) Außerdem korrelieren die Serumspiegel mit einem schlechteren klinischen Outcome (Tarkowski et al., 1995) und sollen als robuster Schlaganfall-Outcomemarker

geeignet sein. (Waje-Andreassen et al., 2005) Nach einem Schlaganfall soll IL-6 auch einen essentiellen Beitrag zur Angiogenese leisten. (Gertz et al., 2012) Weitere protektive Effekte, für die IL-6 verantwortlich sein soll sind: die Reduktion des Hirnödems nach einer Ischämie mittels Senkung der Hirngefäßpermeabilität (Krizanac-Bengez et al., 2003) und die Reduzierung des exzitotoxischen Zelltodes durch Hemmung des NMDA (N-methyl-D-Aspartat) Signalweges. (Ali et al., 2000) IL-6 kann im Hypothalamus eine Verschiebung der Körpertemperatur nach oben hervorrufen. Dieser Mechanismus verursacht jedoch im Zuge des Schlaganfalles eine Schädigung im Hirnparenchym. (Rallidis et al., 2006) In einem Tierversuch wurde gezeigt, dass Mäuse mit einer IL-6 Überexpression schwerere neurologische Schäden aufweisen als Mäuse mit einer normalen Expression. (Campbell et al., 1993)

7.4 MMP-9

MMP-9 gehört zur Gruppe der Zink-abhängigen Proteinasen, von denen es 25 verschiedenen Subtypen gibt. Eine davon sind die Gelatinasen, zu denen auch MMP-9 gezählt wird. (Siegenthaler and Bluhm, 2006) Eine andere Bezeichnung von MMP-9 ist Gelatinase B. (Yang et al., 2007)

Durch eine fokale Ischämie mit nachfolgender Reperfusion wird eine bi-phasische Öffnung der Bluthirnschranke induziert. (Kuroiwa et al., 1985) Die erste Öffnung erfolgt innerhalb einiger Stunden nach dem Infarkt und ist assoziiert mit Gelatinase A (MMP-2). (Chang et al., 2003) In einem zweiten Schritt kommt es zu einer Degenerierung von Proteinen in der Basallamina der zerebralen Blutgefäße. (Fukuda et al., 2004) Während der erste Aufbruch der BHS noch reversibel ist, ist der zweite Aufbruch, der ca. 24 Stunden danach auftritt irreversibel und geht mit einer massiven Gewebsschädigung einher. Somit scheint MMP-9 eine Hauptrolle in der Pathogenese der späteren Gewebsschädigung zu spielen. (Yang et al., 2007)

In einem Tierversuch wurde zudem eine proinflammatorische Eigenschaft von MMP-9 gefunden. Bei Mäusen mit Defizit an MMP-9 wurde eine verringerte Adhäsion der Leukozyten am Gefäßendothel und in weiterer Folge eine verminderte Anzahl von in das Ischämieareal infiltrierenden neutrophilen Granulozyten gefunden. (Gidday et al., 2005)

Die neuroprotektive Wirkung von MMPs beschränkt sich auf eine unterstützende Wirkung auf die neuronalen Regenerationsvorgänge und einer Förderung der neurovaskulären Remodellierung durch Stimulation der Angiogenese. (Zlokovic, 2006)

In mehreren klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass bereits 24 Stunden nach dem Infarkt die MMP-9 Konzentration im peripheren Blutkreislauf deutlich erhöht ist. (Horstmann et al., 2003, Montaner et al., 2001, Vukasovic et al., 2006)

7.5 MRP8/14

MRP 8/14 ist ein Heterodimer und wird in der Literatur auch als Calprotectin, S100A8/S100A9 (Calgranulin A / Calgranulin B), Leukozyten Protein L1 Komplex und 27E10 Antigen bezeichnet. (Striz and Trebichavsky, 2004, Schafer and Heizmann, 1996) Calprotectin wurde erstmalig im Zytoplasma von neutrophilen Granulozyten gefunden. (Dale et al., 1983) Später konnte es auch in Monozyten, Makrophagen (Bhardwaj et al., 1992) und in geringen Mengen in Endothel- und Epidermiszellen (Zwadlo et al., 1986) nachgewiesen werden.

Der Komplex aus MRP8 und MRP14 wird im Zuge der Phagozytenaktivierung im Zytoskelett und der Plasmamembran gebildet. (Altwegg et al., 2007) Durch diesen direkten Zusammenhang mit der Phagozyten-Aktivierung (Foell et al., 2004) wird dem Komplex auch die Eigenschaft als Entzündungsmarker zugeschrieben. (Edgeworth et al., 1991) Die extrazelluläre Sekretion von MRP8/14 geschieht entweder direkt durch stimulierte neutrophile Granulozyten (Boussac and Garin, 2000) und Monozyten (Rammes et al., 1997) oder in Folge des Zelltodes im Zuge der Auflösung der Zellmembran. (Voganatsi et al., 2001)

Der Beitrag von MRP8/14 an der postischämischen Schädigung gestaltet sich wie folgt: Der Komplex bindet an Endothelien und verursacht eine thrombogenetische und inflammatorische Antwort. Diese äußert sich in einer gesteigerten Transkription von proinflammatorischen Chemokinen und Adhäsionsmolekülen und in einer verringerten Expression von Zellverbindungsproteinen im endothelialen Monolayer. (Robinson et al., 2002, Viemann et al., 2005) Aufgrund der hohen Zink-Bindungskapazität ist MRP8/14 auch anti-mikrobiotisch wirksam. (Loomans et al., 1998)

Ziegler et al. gelang es im Rahmen eines Tierversuches nachzuweisen, dass MRP8/14 nach einer ischämischen Hirnschädigung einerseits aufreguliert ist und andererseits zur Schädigung beiträgt. (Ziegler et al., 2009) Altwegg et al. zeigten in einer Arbeit, dass MRP8/14 als sensitiver Marker für akute Koronarsyndrome geeignet ist. (Altwegg et al., 2007) Darüber hinaus wurden noch Korrelationen mit dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen (Ionita et al., 2010, Healy et al., 2006) der vaskulären Entzündungsantwort nach verschiedenen Gefäßerkrankungen (Croce et al., 2009) gefunden.

7.6 Neutrophile Elastase

Neutrophile Elastase ist auch unter der Bezeichnung Leukozyten Elastase und ELA2 (Elastase 2) bekannt. Es handelt sich dabei um eine Serin-Protease, die als zytotoxischer Mediator im Zytoplasma von neutrophilen Granulozyten vorkommt. (Takahashi et al., 1988) NE wird während der myeloischen Differenzierung gebildet und in der azurophilen Granula gespeichert. (Gabay et al., 1989)

Erhöhte Plasmaspiegel von neutrophiler Elastase wurden bei Patienten mit akutem zerebralem Schlaganfall gefunden. (Iwatsuki et al., 1998, Grau et al., 1995) NE ist verantwortlich für die Degradierung von Elastin, Fibronectin, Kollagen Typ IV und Laminin. (Adachi et al., 1993, Weiss and Regiani, 1984, Sturrock et al., 1998)

Wie bereits zuvor beschrieben, sind aktivierte neutrophile Granulozyten an der Hirnschädigung, verursacht durch Ischämie, beteiligt. (Bednar et al., 1991, Chopp et al., 1994, Ember et al., 1994, Matsuo et al., 1995, Man et al., 2007) Im Zuge der Entzündungsreaktion nach einem ischämischen Infarkt kommt es zu einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, die in weiterer Folge Elastase freigelassen. Diese degeneriert die Komponenten der extrazellulären Matrix, zu denen auch die endotheliale Basalmembran gehört. (Shimakura et al., 2000)

In einer Studie wurde bei MCAO Mäusen festgestellt, dass neutrophile Elastase einen Beitrag an der Infarktgröße, an der Bildung von Ödemen, an der Schädigung der BHS und an der Adhäsion von Leukozyten nach einem ischämischen Infarkt leisten. (Stowe et al., 2009)

Der schädigende Beitrag von neutrophiler Elastase wurde auch in einer weiteren Arbeit, in der der Einsatz des selektiven NE- Inhibitors Silvastatin getestet wurde, bestätigt. Während in der Kontrollgruppe die meisten der Mikrogefäße im Infarktareal strukturell zerstört waren, waren diese bei den Silvastatin behandelten Mäusen zum größten Teil noch intakt. (Ikegame et al., 2010)

Matsuse et al. beschreiben in ihrer Arbeit NE als Entzündungsmarker, der als Indikator für die Schwere einer Pneumonie geeignet ist. (Matsuse et al., 2007) In einer aktuellen Arbeit konnte eine statistisch signifikante Korrelation von NE Plasmawerten mit der Permeabilität der Lungengefäße gefunden werden. (Tagami et al., 2011)

7.7 NGAL

Das beim Menschen bekannte neutrophile Gelatinase assoziierte Lipocalin (NGAL) wird auch Lipocalin 2 (Ip et al., 2011) und 24p3 genannt. Es handelt sich dabei um ein kleines Protein, bestehend aus 178 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 25kD, welches zur Lipocalin Familie gehört. (Flower, 1996) Ursprünglich wurde die Lipocalin-Proteine als Transportproteine klassifiziert; heute ist jedoch bekannt, dass sie in verschiedene Prozesse, die in Verbindung mit der Zellproliferation bei Tumorerkrankungen, Apoptose und Entzündung stehen. (Bratt, 2000)

Darüber hinaus ist NGAL in die anti-mikrobielle Verteidigung involviert indem es an sogenannte Siderophore bindet und den Bakterien das für ihr Wachstum benötigte Eisen belagert. (Yang et al., 2002) Siderophore sind kleine eisenbindende Moleküle, die von den Bakterien synthetisiert und für die Eisenaufnahme benötigt werden. (Cowland et al., 2003) Der bakteriostatische Effekt wurde auch durch in vitro Studien belegt. (Goetz et al., 2002, Flo et al., 2004) Außerdem wurde NGAL die Rolle als akut-Phase Protein, (Liu and Nilsen-Hamilton, 1995) als pro-Apoptose Faktor für Mikroglia Zellen bei Mäusen (Lee et al., 2007) und als autokriner Mediator der reaktiven Astrozytose (Lee et al., 2009) zugeschrieben.

NGAL wird von tubulären Nierenzellen als Antwort auf Verletzungen produziert. Deshalb wurde das Protein als Biomarker für akute Nierenschädigung und als Prognosemarker für Nierenschädigungen etabliert. (Bolignano et al., 2010)

In klinischen Studien bei atherosklerotische Gefäßerkrankungen wurde die Leukozytenaktivierung und die Endothel-iniziierte vasodilatatorische Funktion untersucht. Dabei wurden erhöhte Plasmawerte von NGAL in akuten ischämischen Hirnerkrankungen gefunden. (Elneihoum et al., 1996) Die Ergebnisse eines Tierversuches lassen die Vermutung zu, dass Neuronen ein potentiell Ziel für NGAL sind, da diese das Protein aufnehmen. (Ip et al., 2011) Es existieren noch keine Daten über die genaue Rolle von NGAL in Modellen von ischämischen Hirn Erkrankungen.

7.8 PRDX-1

In den letzten Jahren sind die Peroxiredoxine immer mehr in den Focus bei der Erforschung der Rolle von Antioxidantien gerückt. Säugetiere exprimieren sechs Isoformen von Peroxiredoxinen (1-6). Diese können verschiedenen Arten von Peroxiden, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid, organische Hydroperoxidasen und Peroxynitrit, reduzieren. (Trujillo et al., 2007) Es wurde herausgefunden, dass die Peroxiredoxine fast überall und in großen Mengen nachgewiesen werden können. (Wood et al., 2003) Sie machen fast 1% des zellulären Gesamtproteingehaltes aus. (Rhee et al., 2005)

Vor allem Peroxiredoxin-1 konnten an mehreren Etappen der Apoptose Beteiligungen nachgewiesen werden. Einerseits soll es die Sekretion der proinflammatorischen Cytokine TNF- α und IL-6 stimulieren, indem es an den Toll-like Rezeptor 4 bindet, (Riddell et al., 2010) und andererseits verhindert es durch seine Rolle als Antioxidant einen Anstieg von ROS und der damit einhergehenden Schädigung von zellulärer DNS. (Egler et al., 2005, Toyokuni, 1999) Darüber hinaus kann es die Expression vom Adhäsionsmolekül-1 reduzieren und die damit verbundene Anhaftung und Migration der Bluthirnschranke von Leukozyten eindämmen. (Schreibelt et al., 2008, Ha et al., 2012) Ausserdem soll es den Apoptose-Signal-Regulierende Kinase 1 (ASK-1) Signalweg als endogener Antagonist von ASK-1 regulieren. (Kim et al., 2008)

PRDX-1 gehört mit den Isoformen 2,3 und 4 zur Gruppe der 2-Zystein Peroxiredoxine. (Neumann et al., 2009) In der Literatur wird PRDX-1 auch als pag (Proliferation-assoziiertes-Gen) und MSP23 bezeichnet. (Ishii et al., 1993, Prospero et al., 1993)

Die Antioxidantische Reaktion läuft wie folgt ab: Zuerst katalysiert PRDX die Reduktion von Hydroperoxiden zum entsprechenden Alkohol:



In einem zweiten Schritt wird PRDX mit Hilfe der Wasserstoffatome von Thioredoxin wieder zurückreduziert. (Neumann et al., 2009, Egler et al., 2005)

Im humanen Hirn konnte PRDX-1 sowohl im Kleinhirn als auch im Cortex und Hippocampus nachgewiesen werden. (Dammeyer and Arner, 2011) Andere Regionen sind bis dato noch nicht auf eine Immunreaktivität für PRDX-1 getestet worden.

Im adulten Maushirn konnte PRDX-1 vor allem in Oligodendrozyten und Astrozyten nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine schwach positive Immunreaktion in Neuronen gefunden. (Goemaere and Knoops, 2011)

In einer aktuellen Publikation wurde nachgewiesen, dass PRDX-1 erst 12 Stunden nach einer zerebralen Ischämie in den extrazellulären Bereich freigelassen wird und dass der Einsatz von Anti-Peroxiredoxin Antikörpern die Größe des Infarktareals und die Entzündungsreaktion minimiert. (Shichita et al., 2012)

9 Material und Methoden

9.1 Patienten

Die Teilnehmer wurden aus allen erwachsenen Patienten rekrutiert, die im Zeitraum vom 24.08.2009 bis zum 31.05.2010 einen akuten ischämischen Schlaganfall erlitten haben und an der Stroke Unit der Universitätsklinik für Neurologie des Landeskrankenhauses Graz behandelt worden sind.

Um sich für die Studienkohorte zu qualifizieren, mussten folgende Einschlusskriterien erfüllt werden:

- es musste ein ischämischer Insult vorliegen
- der Symptombeginn durfte nicht weiter als 24h zurückliegen
- ein Mindestalter von 18 Jahren
- ein NIHSS von >3 bei Aufnahme

Es wurden folgende Ausschlusskriterien festgelegt um eine isolierte Sicht auf das Krankheitsbild des akuten ischämischen Schlaganfalles zu bekommen und die Gefahr der Ergebnisverfälschung zu minimieren:

- mRS >1 vor dem akuten Ereignis
- Rückbildung der Symptomatik innerhalb von 24h (→TIA)
- Intrazerebrale Blutung, Subarachnoidalblutung, Sinusvenenthrombose, intrakranieller Tumor
- Klinische, laborchemische oder radiologische Anzeichen für akute erregerbedingte entzündliche Erkrankung
- Leukozyten-Wert oberhalb des oberen Normbereiches
- Präexistente Herzinsuffizienz im Stadium NYHA III/IV
- Aktive maligne Prozesse
- Größere chirurgische Eingriffe innerhalb der letzten 4 Wochen vor dem Ereignis und innerhalb der ersten Woche nach dem Infarkt

- Transfusion von Blut oder Blutbestandteilen innerhalb der letzten 4 Wochen vor dem Ereignis und innerhalb der ersten Woche nach dem akuten Schlaganfall
- Erkrankungen, die eine chronische Hämodialyse erfordern
- Akute mechanische Rekanalisation eines okkludierten Segments einer intrakraniellen Arterie oder der Arteria carotis interna

Für die vergleichenden Analysen wurden 60 Probanden, die als Kontrollen dienten, rekrutiert. Diese wurden, soweit möglich, alters- und geschlechtsspezifisch gematched, und in 2 Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe bestand aus 29 gesunden Teilnehmern und die zweite aus 30 Patienten mit Status post Stent, welcher sich durch PTA (Perkutane transluminale Angioplastie) einer intrakraniellen Arterie oder der Arterie vertebralis darstellt. Die Blutabnahme bei der zweiten Gruppe erfolgte frühestens einen Monat nach Setzung des Stents im Rahmen eines Nachsorgeprotokolls. Zum Zeitpunkt der Blutabnahme hat weder eine neurologische Ausfallssymptomatik noch ein Hinweis auf eine Infektion bestanden.

Diese Studie ist durch die Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz unter dem Aktenzeichen 19-063 ex 070/8, IRB00002556 geprüft und genehmigt worden. Es sind alle teilnehmenden Patienten aufgeklärt worden und es wurde nach der Aufnahme eine schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme eingeholt. Falls dies aufgrund des medizinischen Zustandes nicht sofort möglich war, wurde das Einverständnis nach dem Wiedererlangen der Geschäftsfähigkeit eingeholt.

9.2 Klinik und Labor

Es wurden die folgenden klinischen Variablen von den Studienteilnehmern erhoben:

Der Zahlenwert auf der Schlaganfall Skala des nationalen Institutes für Gesundheit (NIHSS) bei der Aufnahme: dieser spiegelt numerisch den Schweregrad des Schlaganfalls wieder. Dieser Wert ergibt sich aus der Summe von 15 Einzelscores die vom Patienten mit verschiedenen Items erhoben werden. (Brott et al., 1989) Ein Erhebungsbogen für diesen Wert ist im Anhang dieser Arbeit ersichtlich. Es können Werte von 0 – 42 erreicht werden; je höher der Wert, desto schwerwiegender wird das Krankheitsbild interpretiert. (Schwab et al, 1999)

Der Zahlenwert auf der modifizierten Rankin Skala (mRS) vor dem Infarkt: Mit Hilfe der mRS Skala wird der Grad der Einschränkung nach einem Schlaganfall erhoben. (Poeck and Hacke, 2006) Der Wert wurde ein zweites mal 90 Tage nach dem Ereignis, zur Beurteilung des Langzeitverlaufes, mittels Telefoninterview mit den Patienten selbst oder ihren Pflegern erhoben. Telefonisch deshalb, da hierfür die Patienten nicht erneut an der Klinik vorstellig werden mussten und sich damit die selben Ergebnisse wie bei einer Face to Face Befragung erzielen lassen. (Janssen et al., 2010) Um die Reabilität der erhobene mRS Werte auf ein höchstmögliches Maß zu bringen, ist vor der Erhebung das Onlinetrainingsprogramm auf <http://www.rankinscale.org/> absolviert worden. Der mRS-Wert kann 0 – 6 Punkte haben. (siehe Tabelle 1)

0	Keinerlei Symptome keine Einschränkung im täglichen Leben
1	Keine signifikante Beeinträchtigung trotz Symptomen alle früheren Aufgaben und Aktivitäten können ausgeführt werden
2	Leichte Beeinträchtigung es können nicht mehr alle früheren Aktivitäten ausgeführt werden
3	Mäßige Beeinträchtigung es wird Hilfe benötigt; selbstständiges Gehen ist aber möglich
4	Mittelschwere Beeinträchtigung ohne Hilfe nicht gehfähig; Hilfe für Körperpflege notwendig
5	Schwere Beeinträchtigung bettlägrig, inkontinent; Dauerpflege nötig
6	Tod

Tabelle 1: modifizierte Rankin Skala nach (van Swieten et al., 1988)

Zusätzlich wurde die Schlaganfall Klassifizierung nach dem Schlaganfall Projekt der Oxfordshire Gesellschaft (OCSP) (Bamford et al., 1991) und der Kausativen Klassifizierung des Schlaganfall Systems (CCS) (Arsava et al., 2010, Ay et al., 2007) erhoben. Die Einteilung nach OCSP erfolgt anhand der Symptome. Grob wird zwischen einem Syndrom des vorderen und hinteren Kreislaufes sowie in lakunäre Syndrome unterteilt. (Bamford et al., 1991) Beim vorderen Syndrom wird je nach Ausdehnung des Infarktareals zwischen Total Anterior Circulation Syndrom (TACS) und Partial Anterior Circulation Syndrom (PACS) unterschieden. Wenn der hintere Kreislauf betroffen ist, spricht man von einem Posterior Circulation Syndrome (POCS), und falls reine motorische, sensible oder sensomotorische Symptome ohne kortikale Zeichen auftreten, spricht man von einem lakunären Syndrom (LACS). Die Lokalisation und die Häufigkeit der einzelnen Klassen ist in dargestellt. (Fluri and Lyrrer, 2008)

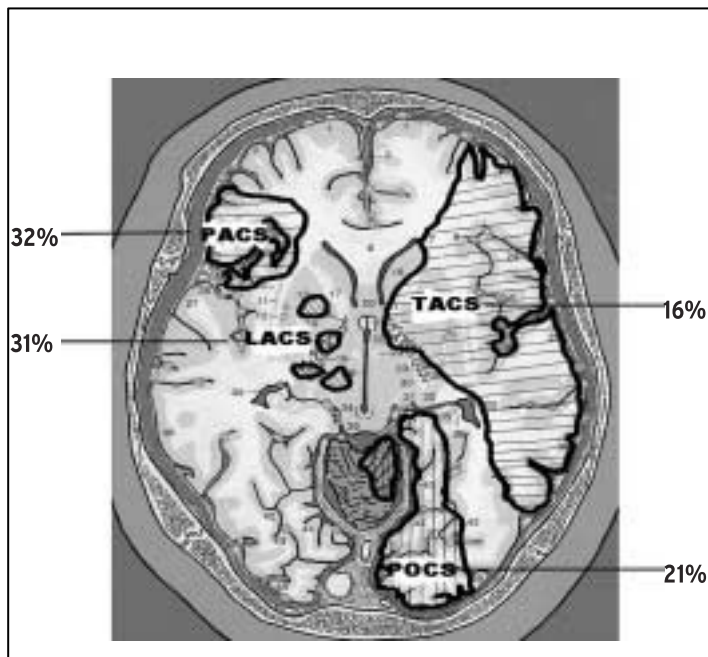


Abbildung 3: Lokalisation und Häufigkeit der OCSP Klassen; aus (Fluri and Lyrrer, 2008)

Laborparameter wurden folgende bestimmt: Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten, C-Reaktives Protein (CRP) und die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR). Weiters wurde geschaut, ob die Patienten an einem bestehenden oder neu aufgetretenen Vorhofflimmern leiden und ob Infektionen auftraten. Folgende zerebrovaskuläre Risikofaktoren wurden anhand des Aufnahmebogens und der verschriebenen Medikamente bei der Entlassung notiert: Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus. Ein Vorhandensein von Carotis Stenosen oder Verschlüssen wurde via Ultraschall überprüft. Falls ein Verschluss von mehr als 50% gefunden wurde, wurde dies mittels Magnetresonanztomographie validiert, falls keine Kontraindikationen für eine solche Untersuchung bestanden haben. Abschließend wurde noch aufgemerkt, falls eine Antithrombose- oder Antikoagulationstherapie und falls Statin bzw. Atorvastatin verabreicht worden ist. Die klinische Pflege der Patienten erfolgte nach den Richtlinien der europäischen Schlaganfall Organisation.

Die Blutabnahme bei der Aufnahme erfolgte im Zuge der Routineabnahme mittels Punktion der Vene in ein Lithium-Heparin beschichtetes Plasmaröhrchen. Eine zweite Abnahme erfolgte eine Woche (Median 7 Tage; Bereich 5-7) um 8 Uhr

morgens. Dabei wurde ein Serumröhrchen und ein Lithium-Heparin Röhrchen gewonnen. Die Blutproben wurden aliquotiert und bis zu den Testungen bei -80 Grad Celsius gelagert.

9.3 Serologische Bestimmung der Analytkonzentrationen

Die Bestimmung der Serum- bzw. Plasmakonzentrationen der Analyten erfolgte mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und mittels Elektro-Chemilumineszenz (ECL).

Die Serumkonzentrationen von IL-6 wurden im Lipidlabor der Medizinischen Universität Graz mittels ECL auf einem Elecsys® System der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland von einer biomedizinischen Analytikerin gemessen.

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von MMP-9, MRP8/14, neutrophiler Elastase, NGAL, PRDX-1 und Dkk-1 erfolgte mittels kommerziell erhältlicher Sandwich ELISA. Die verwendeten Kits sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

	Firma	Art. Nr.
MMP-9	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK	RPN2614
MRP8/14	Bühlmann, Schönenbuch, Schweiz	EK-MRP8/14
neutrophile Elastase	Cusabio Biotech, Wuhan, China	E08846h
NGAL	BioPorto Diagnostics, Gentofte, Dänemark	Kit037CE
PRDX-1	LOXO GmbH, Dossenheim, Deutschland	E92749HU
Dkk-1	R&D Systems, Minneapolis, USA	DKK100

Tabelle 2: verwendete ELISA Kits

Die Durchführung der ELISA Testungen erfolgte streng nach den Instruktionen der Hersteller und unter Einhaltung der Good laboratory practice. (OECD, 1999)

Die Auswertung wurde mit einem ELISA Reader (SpectraCount™, Fa. Packard) durchgeführt. Die Berechnung der Eichkurve und der endgültigen Konzentrationen erfolgte mit der Software PlateReader V3.0 (Fa. Packard).

9.4 Tiermodell

In dieser Arbeit wurde das sogenannte Fadenmodell verwendet. Dabei handelt es sich um ein standardisiertes Modell zur Erzeugung einer fokalen Ischämie im Gehirn von Ratten und Mäusen.

Die Tiere wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurologie an der Charité in Berlin zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um C57/BL6 Mäuse (n=28). Die fokale zerebrale Ischämie wurde durch Einführung eines silikonbeschichteten Fadens in die Arteria carotis commune, der bis in die Arteria carotis interna vorgeschoben wurde, bis eine proximale Okklusion der Arteria cerebri media (MCA) erreicht werden konnte. Nach 60 Minuten wurde der Faden entfernt um eine Reperfusion für verschiedene Zeitpunkte (1d, 7d, 14d, 28d und 42d) zu ermöglichen. Nach Ablauf der Reperusionsperioden wurden die Mäuse getötet. Daraufhin wurden die Hirne entnommen und für 24 Stunden zum Fixieren in 4% Paraformaldehyd, gelöst in PBS-Puffer, eingelegt.

Die weitere histologische Aufarbeitung wurde vom Verfasser dieser Arbeit selbst im Immunhistologischen Labor der Universitätsklinik für Neurologie selbst durchgeführt. Die Hirne wurden dafür mit zwei Schnitten entlang der Koronalebene in drei gleich große Stücke geteilt und in Histokassetten gegeben. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die Gewebe in PBS-Puffer gelagert um eine Austrocknen zu verhindern. Anschließend wurden die Histokassetten über Nacht in einer Zitadelle (Citadell1000, Fa. Shandon) mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. (Siehe Tabelle 3) Anschließend wurden die Hirnstücke mit der Schnittebene parallel zur Oberfläche in Paraffin eingebettet. Dann wurden mit einem Schlittenmikrotom Schnitte mit einer Stärke von 2µm angefertigt, zum Strecken in ein 39 Grad Celsius warmes Wasserbad gelegt und auf Objektträger aufgezogen. Abschließend wurden die Objektträger über Nacht in einem 57 Grad Celsius (= Schmelztemperatur des verwendeten Paraffins) warmen Brutschrank zur besseren Haftung angebacken.

	Lösung	Dauer
1	50% Alkohol	60'
2	70% Alkohol	60'
3	80% Alkohol	60'
4	96% Alkohol	60'
5	96% Alkohol	60'
6	96% Alkohol	120'
7	100% Alkohol	120'
8	Xylol	120'
9	Xylol	120'
10	Xylol	120'
11	Paraffin	120'
12	Paraffin	120'

Tabelle 3: Protokoll Zitadelle

9.5 Färbung und Immunhistochemie

Für eine erste Betrachtung wurden die Schnitte mit Hämalaun und Eosin gefärbt. Um die ischämischen Regionen identifizieren zu können, wurde die modifizierte Silber Infarkt Färbung (Vogel et al., 1999) angewendet. Da das Ergebnis dieser Färbung aufgrund der geringen Schnittdicke einen für die Detektion zu geringen Kontrast zeigte, kam zusätzlich eine immunhistochemische Färbung des Mikrotubulus-assoziierten-Protein-2 (Map-2) zur Anwendung. Diese Methode wurde als exzellenter Marker für die Identifikation der ischämischen Regionen bei der Ratte beschrieben (Popp et al., 2009) und sollte sich auch bei der Maus als sensitiver Marker eignen. (Dawson and Hallenbeck, 1996, Kitagawa et al., 1989)

Der immunhistochemische Nachweis erfolgte mit der ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Methode. Dabei handelt es sich um eine indirekte Methode, die gegenüber der direkten Methode den Vorteil einer höheren Sensitivität besitzt. Es wird dabei die starke Bindungsaffinität des Glykoproteins Streptavidin zum Biotin ausgenutzt. Ein schematischer Aufbau des stufigen Markierungsaufbaus ist in nachfolgender Abbildung ersichtlich.

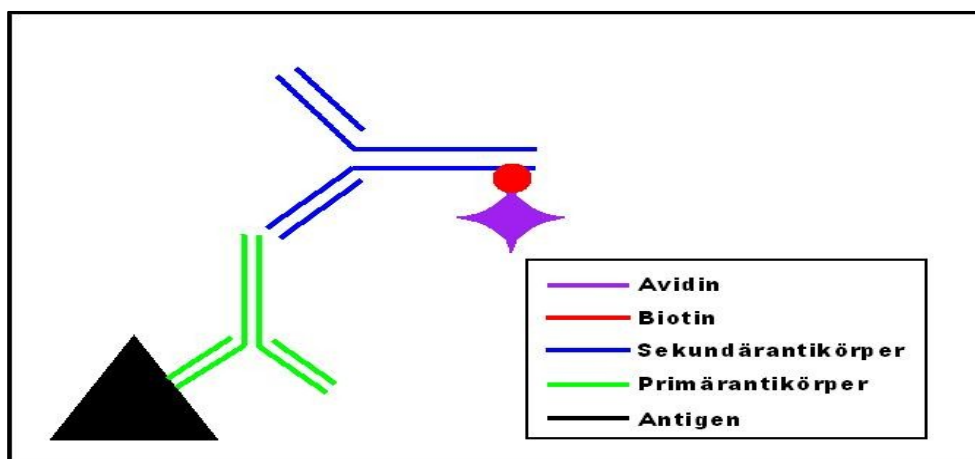


Abbildung 4: Schematische Darstellung der ABC-Methode; adaptiert nach (Noll et al., 2000)

Für die Identifizierung der zellulären Quelle der als Biomarker in Frage kommenden Proteine wurden weitere IHC Färbungen durchgeführt. Die verwendeten Antikörper sind in nachfolgender Tabelle dargestellt:

	Verdünnung	Firma	Ref. Nr.
anti PRDX-1	1:1500	Thermo	PA3-750
anti Mac3	1:100	Biosciences	553322
anti Olig-2	1:1500	abcam	ab85900
anti NeuN	1:100	Millipore	MAB377
anti GFAP	1:200	Labvision	Z0334
anti rabbit	1:200	GE Healthcare	RPN1004V1
anti rat	1:200	GE Healthcare	RPN1005V
anti sheep	1:200	GE Healthcare	RPN1025V
anti mouse	1:200	GE Healthcare	RPN1001V

Tabelle 4: verwendete Antikörper

Die genauen Anwendungsprotokolle sind in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt. Ergänzend dazu muss angemerkt werden, dass bei der Doppelmarkierung für den zweiten Entwicklungsschritt Histogreen (Linaris; E109) und für die Hintergrundreduktion bei der Detektion von Antikörpern mit Isotyp Maus, ein Maus auf Maus Kit (Vektor; BMK-2202) verwendet worden ist.

9.5.1 Protokoll Hämalaun und Eosin Färbung

1. Entparaffinieren bis Aqua Dest
2. 5 min Mayers Häkalaun
3. 2x in Wasser abspülen
4. In HCl-Alkohol differenzieren
5. 2x in Aqua Dest abspülen
6. 5 min Shandon Lösung
7. Abspülen in Aqua Dest
8. 5 min Eosin
9. In aufsteigender Alkohollösung entwässern
10. Eindecken mit Consul Mount (Fa. Shandon, Ref: 9990440)

9.5.2 Protokoll IHC

Tag 1

1. Entparaffinieren: 2x 10 min Xylol
 2x 96% Alkohol
 30 min H₂O₂ – Methanol
 1x 96% Alkohol
 1x 70% Alkohol
 1x 50% Alkohol
 1x Aqua dest
2. Vorbehandlung: 1h Dampfgaren in Zitronensäurepuffer ph 6,0
 1h abkühlen bei Raumtemperatur
3. 3 mal waschen mit PBS-Puffer ph7,4
4. Gewebe mit Dako-Pen eingrenzen
5. Schnitte 20 Minuten mit 10% FCS (gelöst in Dako Antibodydiluent) inkubieren
6. Antikörper auf Schnitte auftragen (AK 1:xxx in 10% FCS)
7. Im Kühlschrank über Nacht inkubieren

Tag 2

1. 3 mal waschen mit PBS-Puffer pH7,4
2. Sekundärantikörper auftragen und 1h bei RT inkubieren
(Sek-AK 1:200 in 10% FCS)
3. 3 mal waschen mit PBS-puffer pH7,4
4. Avidin auftragen und 1h bei RT inkubieren
(Avidin 1:100 in 10% FCS)
5. Schnitte mit DAB-Lösung entwickeln
6. Gegenfärben mit Hämalaun: 5min Hämalaun
2x H₂O
in HCl - Alkohol differenzieren
2x Aqua Dest
5 min Shandon
1x Aqua Dest
aufsteigende Alkoholreihe
n-Butylacetat
7. Eindecken mit Consul Mount (Fa. Shandon, Ref: 9990440)

9.5.3 Protokoll Doppel-IHC

Die Doppelmarkierung wurde analog dem Protokoll für die normale IHC durchgeführt; einziger Unterschied: Die Primärantikörper wurden simultan angeboten und die Schritte Tag 2, Punkt 1-5 wurden 2x nacheinander mit unterschiedlichen Substraten durchgeführt.

9.5.4 Protokoll SIS

1. Schnitte für 2 min in Imprägnierlösung einstellen (auf Schüttler)
2. 6x 1min in Aqua Dest waschen
3. Schnitte für 3 min in Entwickler einstellen (auf Schüttler)

4. 3x 1min in Aqua Dest waschen
5. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
6. Eindecken mit Consul Mount (Fa. Shandon, Ref: 9990440)

9.5.5 Reagenzien und Lösungen

- **50% Alkohol** (Anstaltsapotheke)
- **70% Alkohol** (Anstaltsapotheke)
- **80% Alkohol** (Anstaltsapotheke)
- **96% Alkohol** (Anstaltsapotheke)
- **100% Alkohol (Ethanol absolut)** (Fa. Merck, Ref: 1.00983.1011)
- **Avidin**
 - 1g Avidin (Fa. Sigma, Ref: A3151)
 - 0,5ml Aqua Dest
- **DAB**
 - 1g DAB (Fa. Fluka, Ref: 32750)
 - 40ml PBS
- **DAKO-Puffer**
 - 4ml Dako Wash Buffer (Fa. Dako, Ref: S3006)
 - 36ml Aqua Dest
- **Entwickler:**
 - 20ml 37% Formaldehyd (Fa. Sigma Aldrich; Ref: F1635-500)
 - 70ml Aqua Dest
 - 0,3g Hydroquinon (Fa. Gatt-Koller, Ref: 606070517)
 - 15ml Aceton (Fa. Merck, Ref: 1.00014.1011)
 - 1,1g Tri-natriumcitrat-Dihydrat (Fa. Merck, Ref: 6447)
 - 30-60min bei Raumtemperatur stehen lassen, bis Lösung kupferfarben wird.
- **Eosin** (Fa. Thermo, Ref: 6766010)
- **Imprägnierlösung**
 - 10ml gesättigte Lithiumcarbonatlösung (Anstaltsapotheke)

- 5ml 10% Silbernitratlösung (Anstaltsapotheke)
- Tropfenweise 25% Ammoniak (Fa. Merck, Ref: 1.05423.1000)
zugeben, bis Lösung klar wird
- 75ml Aqua Dest
- **H₂O₂ 30%** (Fa. Merck, Ref: 1.07298.0250)
- **Hämalaun** (Anstaltsapotheke, Rezept LKH Graz)
- **HCl-Alkohol**
 - 100ml 70% Alkohol (Anstaltsapotheke)
 - 0,5ml HCl 37% (Fa. Merck, Ref: 1.00317.1000)
- **Methanol** (Fa. Merck, Ref: 1.06009.1011)
- **N-Butylacetat** (Fa. Merck, Ref: 1.09652.1000)
- **PBS-Puffer**
 - 2l von Stammlösung nach Sörensen (Anstaltsapotheke)
 - 6l Aqua Dest
 - pH einstellen auf 7,4
- **Shandon Lösung** (Fa. Thermo, Ref: 6769002)
- **Zitronensäurepuffer**
 - 10ml von Stammlösung (Anstaltsapotheke)
 - 990ml Aqua Dest
 - pH einstellen auf 6,0

9.5.6 Histologische Auswertung

Die Identifizierung und Markierung der ischämischen Bereiche wurde mit einer 100fachen Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) beziehungsweise makroskopisch durchgeführt. Dazu wurden zuerst unter dem Mikroskop die jeweiligen Bereiche auf dem Map-2 gefärbten Schnitt identifiziert und nachfolgend wurde durch Übereinanderlegen der Objektträger der entsprechende Bereich auf die anderen Schnitte übertragen.

Die Quantifizierung der positiven Zellen wurde bei 200facher Vergrößerung durchgeführt. Hierfür wurde das Großquadrat ($A=0,49\text{mm}^2$) des Zählokulars in der Mitte der Ischämie und der gespiegelten kontra-lateralen Fläche platziert. Bei beiden wurden die Zellen, die eine Immunreaktivität gezeigt haben, gezählt. Die lichtmikroskopischen Bilder wurden mit einer Axio Cam MRc5 von Zeiss aufgenommen und mit der Software Axio Vision 4.7, ebenfalls von Zeiss, weiterverarbeitet.

Die Aufnahmen der Fluoreszenzbilder wurden mit einer DP71 Mikroskopkamera (Fa. Olympus) auf einem BX51 (Fa. Olympus) Mikroskop gemacht. Als Lichtquelle zur Anregung des Fluoreszenzsignals kam eine Mercury Dampf Lampe (Fa. Olympus) zur Anwendung.

Die Scans der Hirnquerschnitte wurden mit einem Canon MP150 Flachbettscanner angefertigt und mit der Software Adobe Photoshop CS5.1 zu einer Bildtafel verarbeitet.

9.6 Statistische Auswertung

Für den zwei Gruppen Vergleich wurde der Student's T-Test, Mann-Whitney's U-Test, der Chi-Quadrat Test oder die Spearman Korrelation verwendet. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen kam die multiple lineare Regression und der Kruskal-Wallis Test zur Anwendung. Für alle Testungen wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen. Die Korrektur für multiples Testen wurde mit der Bonferroni-Holm Methode durchgeführt.

Um zu schauen ob eine Variable das klinische Outcome vorhersagen kann, wurde eine stufenweise lineare logistische Regression durchgeführt. Mit den Variablen, die dabei einen p-Wert von kleiner 0,1 hatten, wurde ein erstes Vorhersagemodell konstruiert und anschließend eine rückwärts eliminierende logistische Regression zur Konstruktion der finalen Vorhersagemodelle. Anschließend wurde eine Receiver Operator Characteristic (ROC) Kurve modelliert und die Flächen unter der Kurve auf einen Unterschied zwischen den verschiedenen Modellen hin untersucht. (DeLong et al., 1988) Die Analyse der ROC Kurven wurde mit der Software MedCalc® 11.6.1. durchgeführt. Alle restlichen statistischen Analysen wurden mit PASW® Statistics 18 bzw. IBM® SPSS® Statistics 20 durchgeführt.

10 Ergebnisse

10.1 Serologie Tag 0

Im ersten Teil der Studie wurden die Dkk-1 und MRP8/14 Plasmawerte der Studienteilnehmer am Aufnahmetag bestimmt. Außerdem wurden die Konzentrationen der jeweiligen Analyten auch im Plasma der beiden Kontrollgruppen (siehe Methodenteil) gemessen.

Von 282 Patienten, die im Studienzeitraum mit einem Schlaganfall oder einer TIA auf die Stroke Unit der Universitätsklinik für Neurologie in Graz gebracht worden sind, waren 57 für die Teilnahme geeignet. (siehe Abbildung 5) Zusätzlich kamen noch die 59 Patienten aus den Kontrollgruppen hinzu. Dies ergab eine Gesamtfallzahl von 106.

Die demographischen Daten und die klinische Charakteristik sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Blutabnahme bei der Kohorte mit akutem ischämischen Schlaganfall hat bei 32 Patienten innerhalb von 12 Stunden und bei 25 Patienten zwischen 12 und 24 Stunden nach Symptombeginn stattgefunden. Sie erfolgte in jedem Fall vor einer eventuellen Thrombolyse, welche bei 18 Patienten als Therapie zur Anwendung kam. Die Patienten hatten NIHSS Werte im Bereich von 4-27 (Median 11) zum Zeitpunkt der Aufnahme.

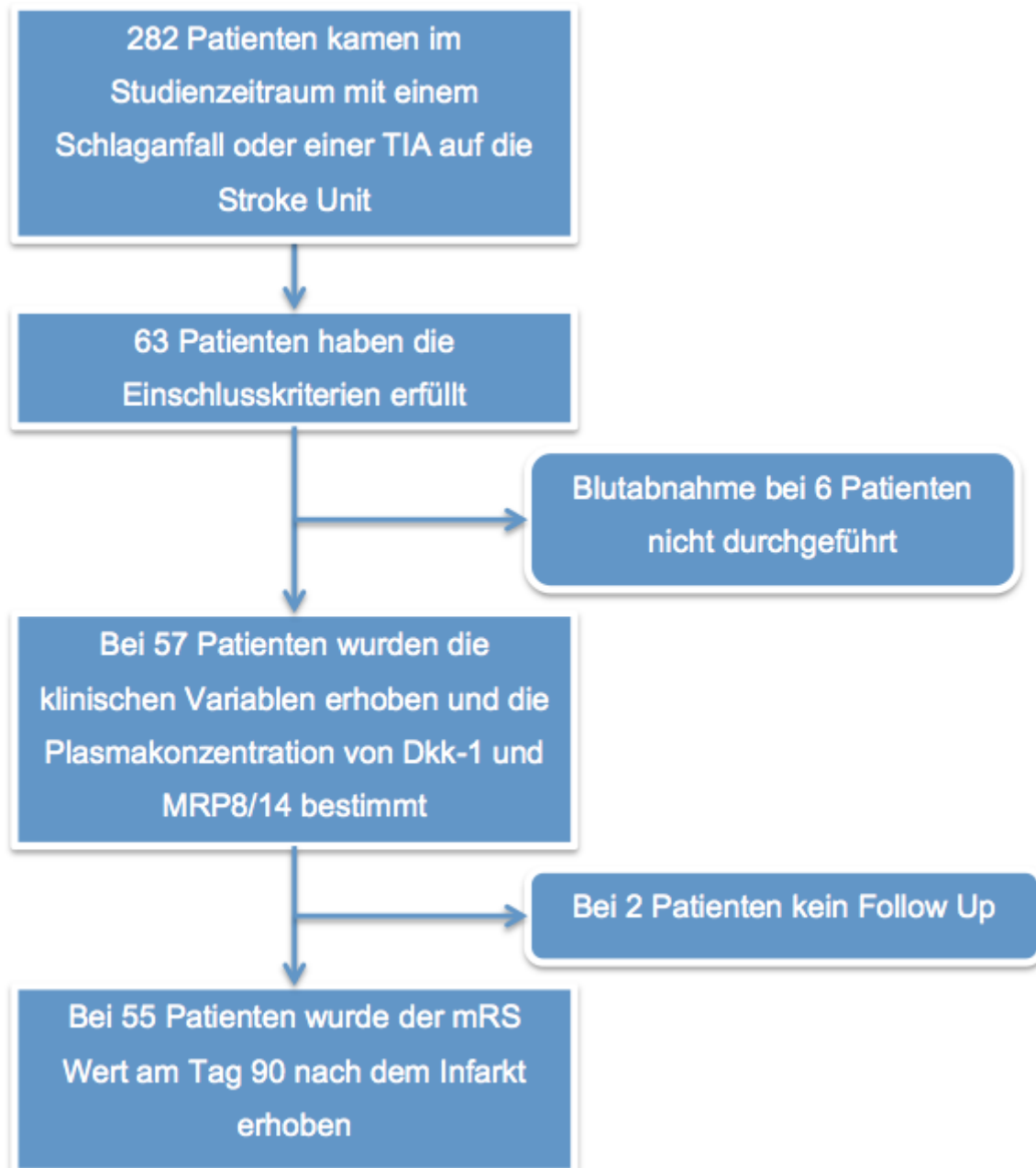


Abbildung 5: Studien Flow Chart für Serologie Tag 0

	Kohorte		
	akuter ischämischer Schlaganfall	stabile zerebrovaskuläre Erkrankung	gesund
Gruppengröße	57	30	29
Alter (Mittelwert & Bereich; in Jahren)	69,7 (24-89)	66,6 (28-79)	53,5 (46-66)
Männer / Frauen	30 / 27	21 / 9	11 / 19
Hypertonie	47 (82,5%)	26 (86,7%)	0
Hypercholesterinämie	27 (47,4%)	30 (100%)	0
Diabetes Mellitus	15 (26,3%)	12 (40%)	0
Vorhofflimmern	25 (43,9%)	0	0
>50% Verschluss der ICA	11 (19,3%)	5 (16,7%)	0
Thrombozytenaggregationshemmer	14 (24,6%)	30 (100%)	0
orale Antikoagulation	8 (14,0%)	2 (6,7%)	0
irgendein Statin	7 (12,3%)	26 (86,7%)	0
Atorvastatin	0	4 (13,3%)	0

Tabelle 5: Demographische Daten, Klinik und Medikation der Patientenkohorten

Bei den NIHSS Werten wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen gefunden. Auch führte die Thrombolyse oder der Zeitpunkt der Blutabnahme zu keinem signifikanten Unterschied. Keiner der Patienten hatte einen Schlaganfall aufgrund einer Klein-Arterien-Okklusion. 14 Patienten (24,6%) bekamen Thrombozytenaggregationshemmer vor dem Insult und acht Patienten (14,0%) erhielten eine Antikoagulationstherapie aufgrund eines nicht rheumatischen Vorhofflimmerns. Vier Patienten (1,4%) wurden aufgrund erhöhter Leukozytenzahlen nicht in die Studie mit eingeschlossen.

Die Leukozytenzahlen korrelieren mit dem NIHSS Wert bei der Aufnahme. ($r=0,32$; $p=0,017$) Dieses Ergebnis deckt sich mit dem einer anderen Gruppe. (Kammersgaard et al., 1999)

Der mRS-Wert am Tag 90 konnte bei 55 Patienten (96,5%) erhoben werden. Zwei Patienten waren zum Zeitpunkt des Follow up nicht mehr erreichbar. 15 Patienten (26,3%) erholten sich wieder auf einen mRS Wert kleiner zwei und 7 Patienten verstarben. Der mediane mRS Wert am Tag 90 betrug für die gesamte Kohorte 4. Das Ergebnis der multiplen linearen Regressionsanalyse hat gezeigt, dass ein niedriger mRS Wert am Tag 90 von einem niedrigen NIHSS Wert bei der

Aufnahme ($p < 0,001$) und der Anwendung einer thrombolytischen Therapie ($p = 0,004$) vorhergesagt wird.

Die Referenzkohorten, bestehend aus Patienten mit stabiler zerebrovaskulärer Erkrankung, bestehend aus 21 Männern und 9 Frauen, und gesunden Probanden, bestehend aus 11 Männern und neun Frauen, dienten als Vergleichsgruppen. Die klinische Charakteristik und die Medikation ist in Tabelle 5 dargestellt.

10.1.1 DKK-1

Die Dkk-1 Plasmaspiegel unterscheiden sich signifikant zwischen den Gruppen ($p < 0,001$). Die gemessene Konzentration im Plasma war bei der Schlaganfall Kohorte signifikant höher (Mittelwert: 847,8pg/ml; Median: 727,1pg/ml) als bei den Patienten mit stabiler zerebrovaskulärer Erkrankung (Mittelwert: 634,9pg/ml; Median: 523,9pg/ml; $p = 0,038$) und bei den gesunden Kontrollen (Mittelwert: 414,8pg/ml; Median: 371,3pg/ml; $p < 0,001$). (Siehe Abbildung 6)

Der Unterschied der Dkk-1 Werte zwischen den Patienten mit stabiler Erkrankung und den gesunden Patienten war auch signifikant ($p = 0,010$).

Das Alter der Patienten korrelierte nur in der Kohorte mit akutem ischämischen Schlaganfall mit den Dkk-1 Werten ($r = 0,34$; $p = 0,009$).

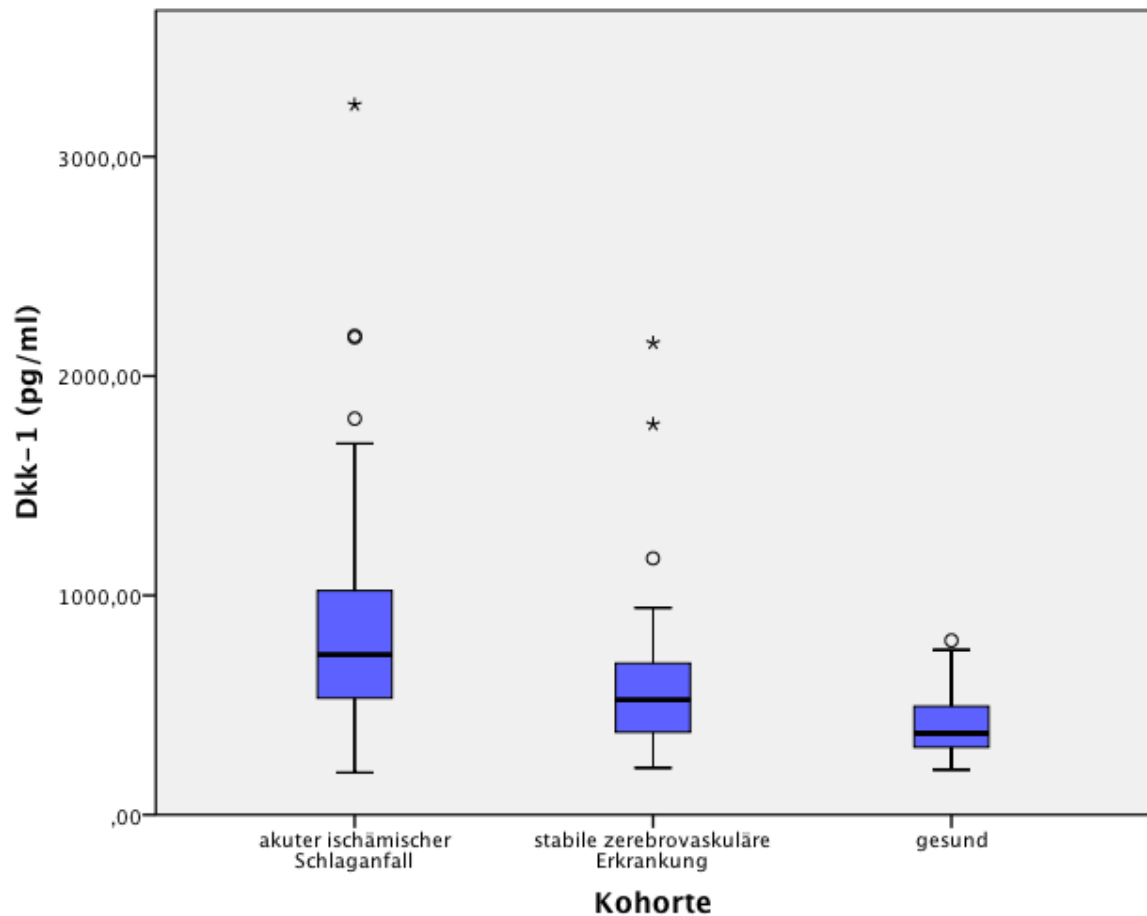


Abbildung 6: Dkk-1 Spiegel im Plasma

Um mögliche Störfaktoren auszuschließen, wurden die Dkk-1 Werte innerhalb der einzelnen Gruppen hinsichtlich eines möglichen Einflusses untersucht. Es konnten weder Zusammenhänge mit demographischen Daten noch mit Klinik und Medikation gefunden werden. Es wurde zwar eine Reduzierung der peripheren Dkk-1 Konzentration durch Atorvastatin beschrieben (Perez Castrillon et al., 2010, Sondergaard et al., 2009), jedoch bekam keiner der teilnehmenden Patienten diese Medikation. Auch der Zeitpunkt der Blutabnahme konnte als Störgröße ausgeschlossen werden.

Es konnte keine Korrelation der Dkk-1 Werte mit dem NIHSS bei der Aufnahme ($r=0,007$; $p=0,96$) oder mRS am Tag 90 ($r=-0,053$; $p=0,70$) gefunden werden. Auch unterschied sich die Plasmakonzentration von den genesenen Patienten (mRS < 2 am Tag 90) nicht mit derer der restlichen Patienten (Median 692,6 vs.

730,4pg/ml; $p=0,70$). Somit kann eine Eignung der Dkk-1 Konzentration am Tag 0 im peripheren Blutkreislauf als Outcomemarker ausgeschlossen werden.

10.1.2 MRP8/14

Bei den MRP8/14 Plasmawerten konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mittels Kruskal-Wallis Test ausgeschlossen werden ($p=0,762$). Der Zweigruppenvergleich mittels T-Test brachte ebenfalls keinen Unterschied zwischen der Gruppe mit akutem ischämischen Schlaganfall (Mittelwert: 5,1 $\mu\text{g/ml}$; Median: 2,8 $\mu\text{g/ml}$), der stabilen Kohorte (Mittelwert: 4,5 $\mu\text{g/ml}$; Median: 3,8 $\mu\text{g/ml}$; $p=0,558$) und den gesunden Kontrollen (Mittelwert: 3,8 $\mu\text{g/ml}$; Median: 3,4 $\mu\text{g/ml}$; $p=0,184$). (siehe Abbildung 7)

Das Alter der Patienten korrelierte mit den MRP8/14 Werten ($r=0,299$; $p=0,001$). Die isolierte Betrachtung der Schlaganfall Kohorte hinsichtlich dieser Eigenschaft zeigte ebenfalls ein signifikantes Ergebnis ($r=0,306$; $p=0,022$).

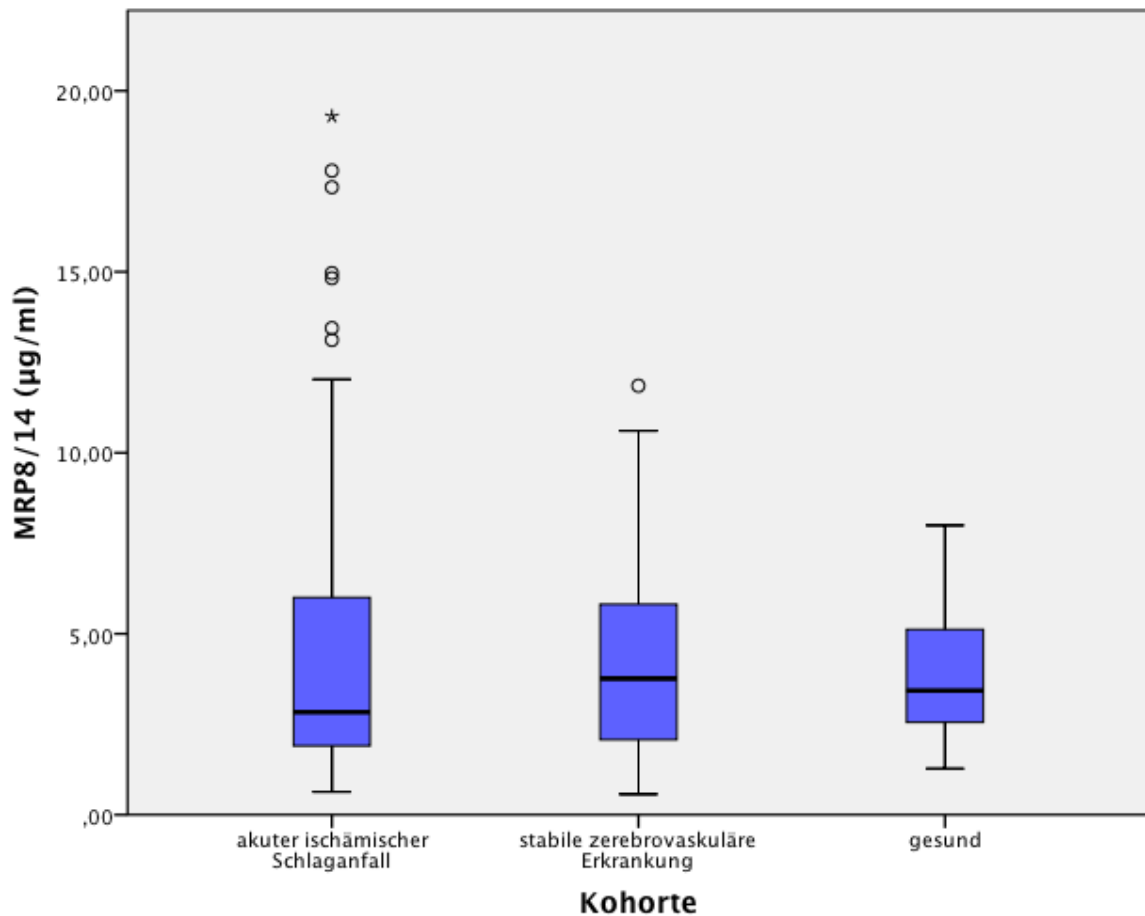


Abbildung 7: MRP8/14 Spiegel im Plasma

Es konnte keine Korrelation der MRP8/14 Werte mit dem NIHSS zum Zeitpunkt der Aufnahme ($r=0,95$; $p=0,483$), mit dem mRS am Tag 90 ($r=0,136$; $p=0,323$) oder mit dem Auftreten von Infektionen ($r=0,254$; $p=0,096$) gefunden werden. Darüber hinaus war keine Korrelation mit einer eventuellen Genesung der Patienten (mRS<3 am Tag 90) und auch kein Unterschied der Plasmakonzentrationen zwischen den genesenden und nicht genesenden Patienten feststellbar. Daher kann auch die MRP8/14 Konzentration am Tag 0 im peripheren Blutkreislauf als Prognosemarker ausgeschlossen werden.

10.1.3 PRDX-1

Die Konzentration von PRDX-1 im Patientenblut sollte mittels ELISA gemessen werden. Mit dem dafür vorgesehen Kit (siehe Methodenteil) war dies allerdings nicht möglich, da kein ausreichendes Signal detektiert werden konnte. Dafür kommen 2 Möglichkeiten in Frage:

1. die Konzentration im peripheren Kreislauf liegt unter der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA-Kits
2. die nach Ischämie im Gehirn erhöhten Proteinspiegel von PRDX-1 (Dayon et al., 2011) gelangen nicht in den peripheren Blutkreislauf

Für die Abklärung von Punkt eins wurde ein anderer ELISA Kit (E92749Hu, USCN Life Science, Wuhan, China) mit einer besseren Sensitivität von 6,1pg/ml im Vergleich zu 160pg/ml bei zuerst verwendetem Kit. Da auch hiermit keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde aus Kostengründen von einer weiteren Untersuchung abgesehen werden.

10.2 Serologie Tag 7

Im zweiten Teil wurden im Plasma der Studienteilnehmer, das 7 Tage nach dem Schlaganfall abgenommen worden ist, die Konzentrationen von MMP-9, MRP8/14, neutrophiler Elastase und NGAL bestimmt; außerdem im Serum, welches zum selben Zeitpunkt abgenommen worden ist, IL-6.

In diesem Studienteil betrug die Fallzahl nur mehr 46 (siehe Abbildung 8). Der Verlust an Patienten war bedingt durch 5 Todesfälle und Verlegungen an andere Kliniken.

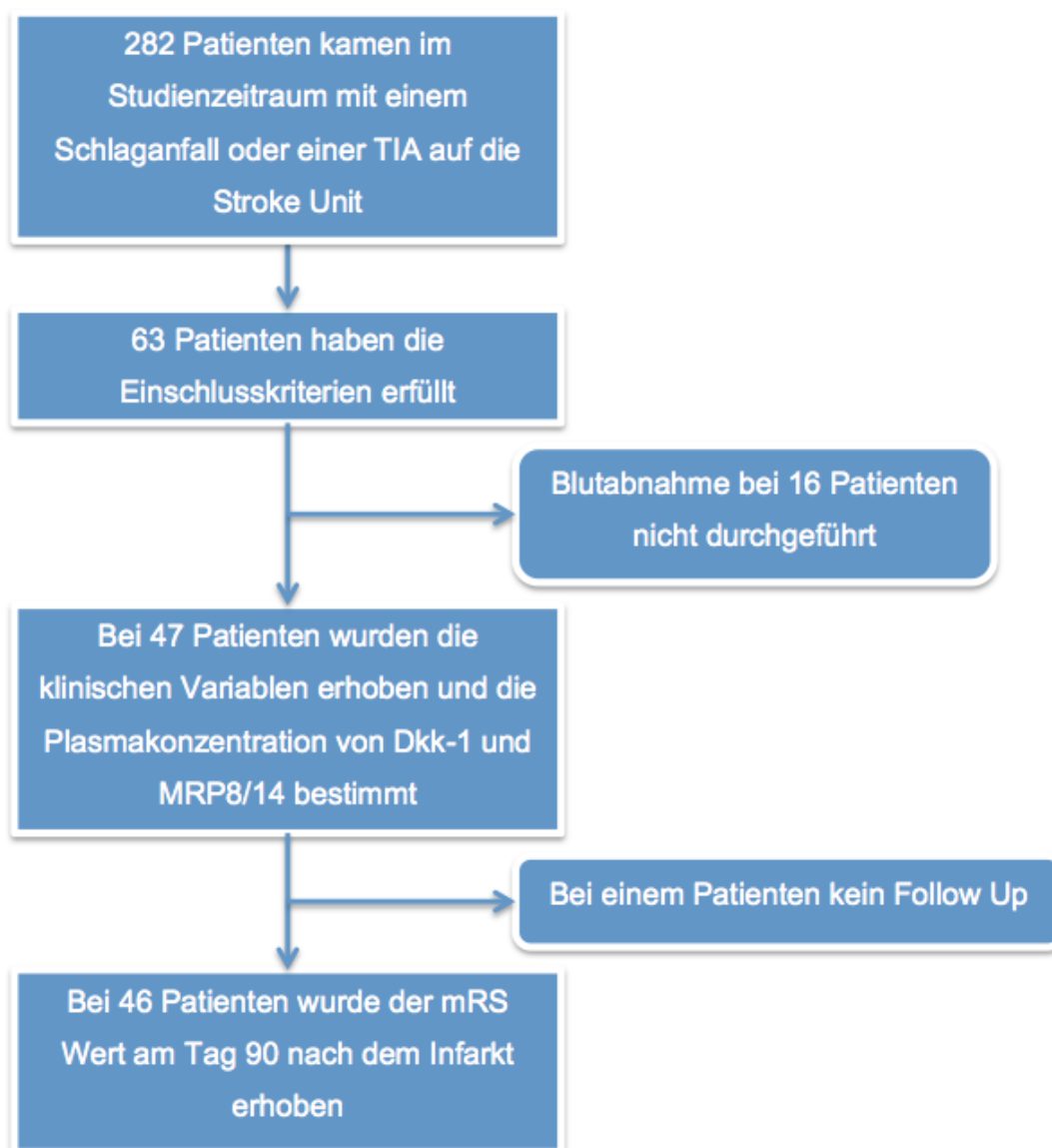


Abbildung 8: Studien Flow Chart für Serologie Tag 7

Die demographischen Daten, klinische Charakteristik, zerebrovaskuläre Risikofaktoren und die Schlaganfall Klassifizierung sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

	alle Patienten	gutes Outcome	schlechtes Outcome	p
n	46	13	33	-
Alter in Jahren; Median (IQR)	71 (63-79)	68 (54-74)	76 (63-79)	0,107
weibliches Geschlecht (n)	47,8% (22)	53,8% (7)	45,5% (15)	0,987
NIHSS; Median (IQR)	11 (6-17)	6 (5-8)	13 (7-18)	0,002
Thrombolyse (n)	26,1% (12)	38,5% (5)	21,2% (7)	0,276
post-Stroke Infektionen (n)	58,7% (27)	23,1% (3)	72,7% (24)	0,006
eGFR; MW (IQR); ml/min/1.7	75,6 (85,4-65,7)	69,6 (80,6-58,7)	77,9 (89,0-66,8)	0,269
Hypertonie (n)	84,8% (39)	100% (13)	78,8% (26)	0,166
Hypercholesterin-ämie (n)	47,8% (22)	61,5% (8)	42,4% (14)	0,4
Diabetes Mellitus (n)	21,7% (10)	23,1% (3)	21,2% (7)	1.000

Vorhofflimmern (n)	41,3% (19)	23,1% (3)	48,5% (16)	0,214
hämorrhagische Veränderung (n)	13,0% (6)	7,7% (1)	15,2% (5)	0,659
TACS (n)	41,3% (19)	7,7% (1)	54,5% (18)	0,01
PACS (n)	50,0% (23)	69,2% (9)	42,4% (14)	0,19
POCS (n)	4,3% (2)	15,4% (2)	0%	0,075
LACS (n)	4,3% (2)	7,7% (1)	3,0% (1)	0,49
supraaortale Arteriosklerose	21,7% (10)	7,7% (1)	27,3% (9)	0,24
cardioaortale Embolie (n)	52,2% (24)	46,2% (6)	54,5% (18)	0,853
Okklusion kleiner Arterien (n)	0%	0%	0%	-
andere seltene Ursachen (n)	6,5% (3)	7,7% (1)	6,1% (2)	1,000
unbestimmte Ursachen (n)	19,6% (9)	38,5% (5)	12,1% (4)	0,092

Tabelle 6: Demographische Daten und klinische Charakteristika der Patienten des zweiten Studienteils

Der Median des mRS-Wertes am Tag 90 der Patienten betrug 3. Für weitere Auswertungen wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt: in die erste kamen alle Patienten mit einem guten Outcome (mRS 0-2) und in die zweite die mit einem schlechten Outcome (mRS 3-6). Die Wahl der Grenzen erfolgte aufgrund zuvor publizierter Empfehlungen, diese so zu setzen. (Uyttenboogaart et al., 2005, Hacke et al., 2005)

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den beiden Gruppen beim NIHSS, dem Auftreten von post-stroke Infektionen und dem Anteil an TACS Klassifikationen. (siehe Tabelle 6)

Die gemessenen Proteinkonzentrationen im peripheren Blut der beiden Gruppen sind in nachfolgender Tabelle als Median mit dem Interquartilsbereich aufgelistet.

		gutes Outcome; Median (IQR)	schlechtes Outcome; Median (IQR)	p		mRS at Tag 90; r_s (p)
		35,8 (21,1-79,4) ng/ml	54,2 (27,0-131,7) ng/ml	0,311		0,012 (0,939)
		13,2 (6,4-24,8) pg/ml	17,9 (10,7-32,6) pg/ml	0,218		0,201 (0,179)
		4,4 (3,1-6,8) µg/ml	4,5 (2,8-8,3) µg/ml	0,807		-0,111 (0,466)
		2,1 (1,0-2,7) ng/ml	2,2 (1,3-3,3) ng/ml	0,311		0,140 (0,351)
		43,4 (35,2-84,0) ng/ml	75,7 (56,9-105,8) ng/ml	0,030		0,395 (0,007)*

Tabelle 7: Proteinkonzentration und deren Korrelation mit dem Outcome

Die Plasmakonzentration von NGAL korrelierte signifikant mit dem Outcome (mRS Tag 90) ($r_s=0,395$; $p=0,007$). Bei allen anderen untersuchten Proteinen konnte kein statistischer Zusammenhang mit dem Outcome gefunden werden.

Nachdem alle in diesem Teil getesteten Proteine zuvor als inflammatorische Reaktanten beschrieben worden sind, wurden in weiterer Folge statische Auswertungen in Bezug auf Infektionen durchgeführt.

27 (58,7%) Patienten des Gesamtkollektivs haben post-Schlaganfall Infektionen entwickelt. Davon hatten 17 (63,0%) Harnwegsinfektionen, 8 (29,6%) Pneumonien

und 2 (7,4%) andere Infektionen. Die gemessenen Blutspiegel waren bei Patienten mit Infektionen bei folgenden Proteinen signifikant höher als bei Patienten ohne Infektion: MMP-9 (Median: 69,9ng/ml vs. 33,0ng/ml; $p=0,048$), IL-6 (Median: 21,4pg/ml vs. 8,8pg/ml; $p=0,017$) und NGAL (Median: 43,4ng/ml vs. 86,4ng/ml; $p=0,006$). (siehe Tabelle 8)

Nach der Korrektur für multiples Testen war nur mehr der Unterschied von NGAL statistisch signifikant. Als Korrekturmethode kamen sowohl die Bonferroni Korrektur als auch die Bonferroni-Holm Methode zur Anwendung.

	keine Infektion	post- stroke Infektion;	p	α Bonferroni	α Bonferroni - Holm
	Median (IQR)	Median (IQR)			
MMP-9 (ng/ml)	33,0 (22,2- 80,1)	69,9 (36,2- 138,5)	0,048	0,010	0,017
IL-6 (pg/ml)	8,8 (5,6- 26,1)	21,4 (13,3- 38,4)	0,017	0,010	0,013
MRP8/14 (μg/ml)	3,5 (2,9- 4,9)	5,0 (3,2- 8,9)	0,084	0,010	0,025
Neutrophile elastase (ng/ml)	2,5 (1,7- 3,4)	2,0 (1,3- 2,9)	0,332	0,010	0,050
NGAL (ng/ml)	43,4 (36,2- 79,7)	86,4 (65,3- 110,5)	0,006*	0,010	0,010

Tabelle 8: Proteinspiegel im peripheren Blut eingeteilt nach dem Auftreten von Infektionen

Keine Korrelation wurde zwischen den NGAL-Werten und den maximalen CRP-Werten (gemessen innerhalb von 7 Tagen nach dem Infarkt) gefunden ($r_s=0,232$; $p=0,120$).

In einem weiteren Schritt wurde nun überprüft, ob die statistisch validierte Eignung der Blutspiegel von NGAL am Tag 7 als Outcomemarker einen zusätzlichen Nutzen zu bereits klinisch etablierten Kriterien liefern kann. Hierfür wurden prediktive Modelle für die Vorhersage von gutem oder schlechtem Outcome konstruiert. Zusätzlich zu den klinischen Parametern NIHSS, Patientenalter und Thrombolyse wurde noch die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) miteingebaut, da diese als unabhängiger Prediktor von schlechtem Outcome und Langzeitsterblichkeit bei Schlaganfall beschrieben worden ist. (Yahalom et al., 2009) Die NGAL Konzentrationen zeigten eine negative Korrelation mit der eGFR ($r_s = -0,321$; $p = 0,030$). Dieses Ergebnis deckt sich mit denen einer anderen Gruppe. (Fassett et al., 2011)

In Vorhersagemodell 1 waren enthalten: NIHSS, Patientenalter, Thrombolyse und eGFR. In Modell 2 zusätzlich noch NGAL, um einen eventuellen zusätzlichen Nutzen festzustellen. (siehe Tabelle 9)

Modell	Variable	p	OR (95% CI)	AUC (95% CI)	p
1	NIHSS	0,011	1,433 (1,087-1,890)	0,851 (0,743-0,958)	0,048
	Alter	0,067	1,108 (0,993-1,236)		
	Thrombolyse	0,09	0,015 (0,015-1,344)		
	eGFR	0,202	1,038 (0,980-1,099)		
2	NIHSS	0,016	1,441 (1,071-1,939)	0,935 (0,864-1,000)	
	Alter	0,09	1,120 (0,982-1,277)		
	Thrombolyse	0,096	0,096 (0,007-1,306)		
	eGFR	0,09	1,06 (0,991-1,134)		
	NGAL	0,049	1,029 (1,000-1,059)		

Tabelle 9: Vorhersagemodelle 1 & 2

Das Hinzufügen der NGAL-Werte zu den Variablen aus Modell 1 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Area under the curve (AUC) der generierten ROC-Kurven (Abbildung 9). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die NGAL-Plasmawerte, gemessen eine Woche nach dem Schlaganfall, eine zusätzliche Information über das 90 Tages Outcome des Patienten liefern.

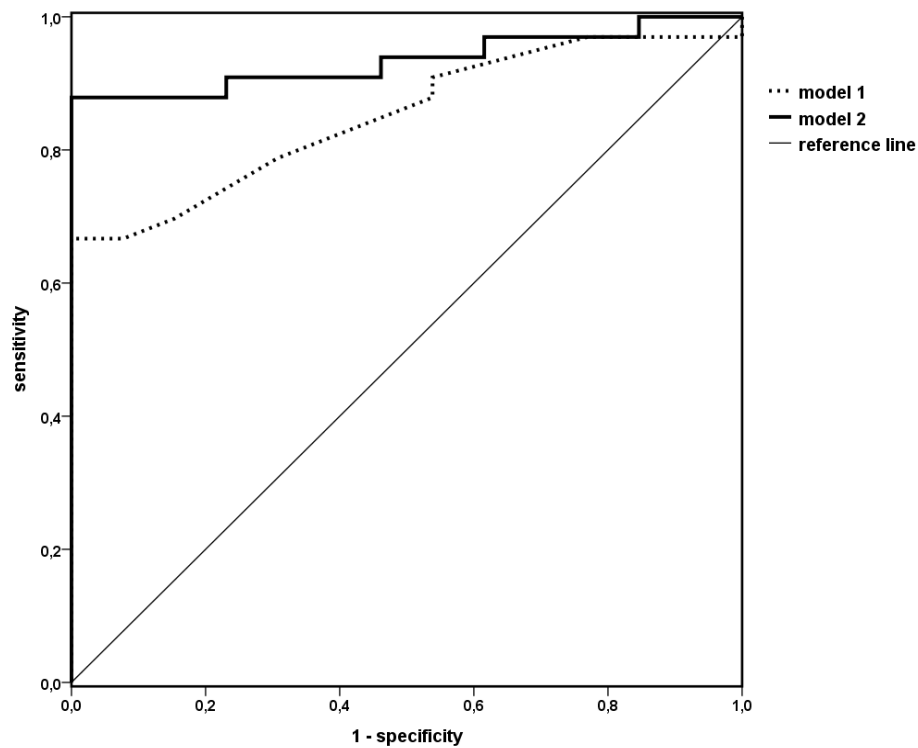


Abbildung 9: ROC-Kurven von Vorhersagemodell 1 & 2

Abschließend wurde noch untersucht, ob der prediktive Wert von NGAL in Zusammenhang mit dem Auftreten von post-Schlaganfall Infektionen steht. Hierfür wurden Modell 3 und 4 generiert. Modell 3 besteht aus NIHSS, Alter, Thrombolyse und Infektionen. In Modell 4 wurden zusätzlich die NGAL-Konzentrationen inkludiert. Beim Vergleich dieser beiden Modelle konnte kein signifikanter Unterschied der Flächen unter den ROC-Kurven festgestellt werden (siehe Tabelle 10)

Modell	Variable	p	OR (95% CI)	AUC (95% CI)	p
3	NIHSS	0,012	1,448 (1,083-1,936)	0,851 (0,743-0,958)	0,179
	Alter	0,161	1,059 (0,977-1,147)		
	Thrombolyse	0,061	0,100 (0,009-1,116)		
	Infektion	0,171	1,697 (0,796-3,617)		
4	NIHSS	0,012	1,439 (1,082-1,915)	0,891 (0,809-0,986)	
	Alter	0,261	1,049 (0,965-1,140)		
	Thrombolyse	0,063	0,099 (0,009-1,137)		
	Infektion	0,339	1,464 (0,670-3,203)		
	NGAL	0,238	1,016 (0,990-1,042)		

Tabelle 10: Vorhersagemodelle 3 & 4

10.3 Tiermodell

Im dritten Teil der Arbeit wurden folgenden Fragestellungen mit Hilfe des MCAO-Modells an der Maus bearbeitet:

- Ist PRDX-1 nach einer Ischämie im Tiermodell nachweisbar?
- Was sind die zellulären Quellen für PRDX-1 nach einer Ischämie?

Bevor diese beiden Fragen beantwortet werden konnten, musste zuerst sichergestellt werden, dass die verwendeten Hirne auch wirklich Ischämie bedingte Schädigungen aufweisen. Deshalb wurden zuerst Schnitte von jedem Maushirn mit der modifizierten Silberfärbung (siehe Methodenteil) gefärbt. Mit Hilfe des erzielten Färbeergebnisses lies sich aber keine genaue Aussage über Auftreten und Lokalisation der Ischämie treffen. Das mag zum einen an der geringen Schnittdicke von 2 Mikrometern als auch an der kurzen Okklusionszeit von 1 Stunde gelegen haben. Deshalb wurden in einem weiteren Schritt eine IHC für Map-2 durchgeführt. Mit Hilfe dieser ist es gelungen bei 25 der 28 Tieren Zeichen einer Ischämie zu identifizieren. Das Färbeergebnis ist in Abbildung 10 ersichtlich.

Wie zuvor beschrieben (Popp et al., 2009), zeigten die geschädigten Areale eine schwächere Immunreaktion als die gesunden Areale.

Desweiteren wurde mit einer weiteren IHC die Einwanderung von Mac3 positiven Makrophagen im Zeitverlauf dargestellt. (siehe Abbildung 10)

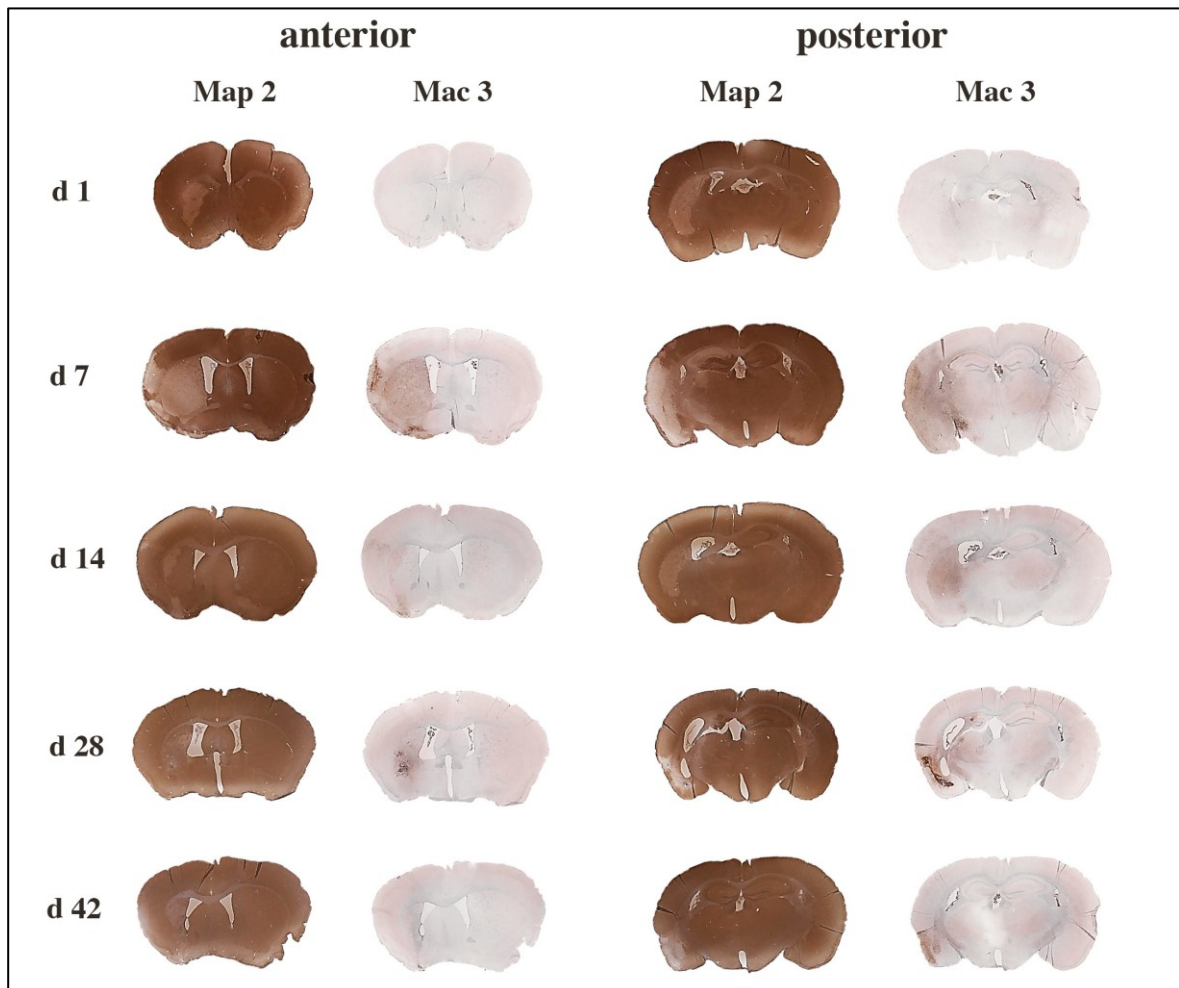


Abbildung 10: Map2 und Mac3 IHC Immunreaktivität im Zeitverlauf

10.3.1 PRDX-1

Peroxiredoxin-1 konnte an allen Zeitpunkten nach MCAO im ischämischen Bereich detektiert werden. (siehe Abbildung 11) Die Quantifizierung der positiven Zellen ergab einen Peak am Tag 14 nach Ischämie. (siehe Abbildung 12)

Desweiteren zeigte sich an allen Zeitpunkten ab Tag 7 ein signifikanter Unterschied in der PRDX-1 positiven Zellzahl zwischen der ischämischen und der kontra-lateralen Hemisphäre. (siehe Tabelle 11)

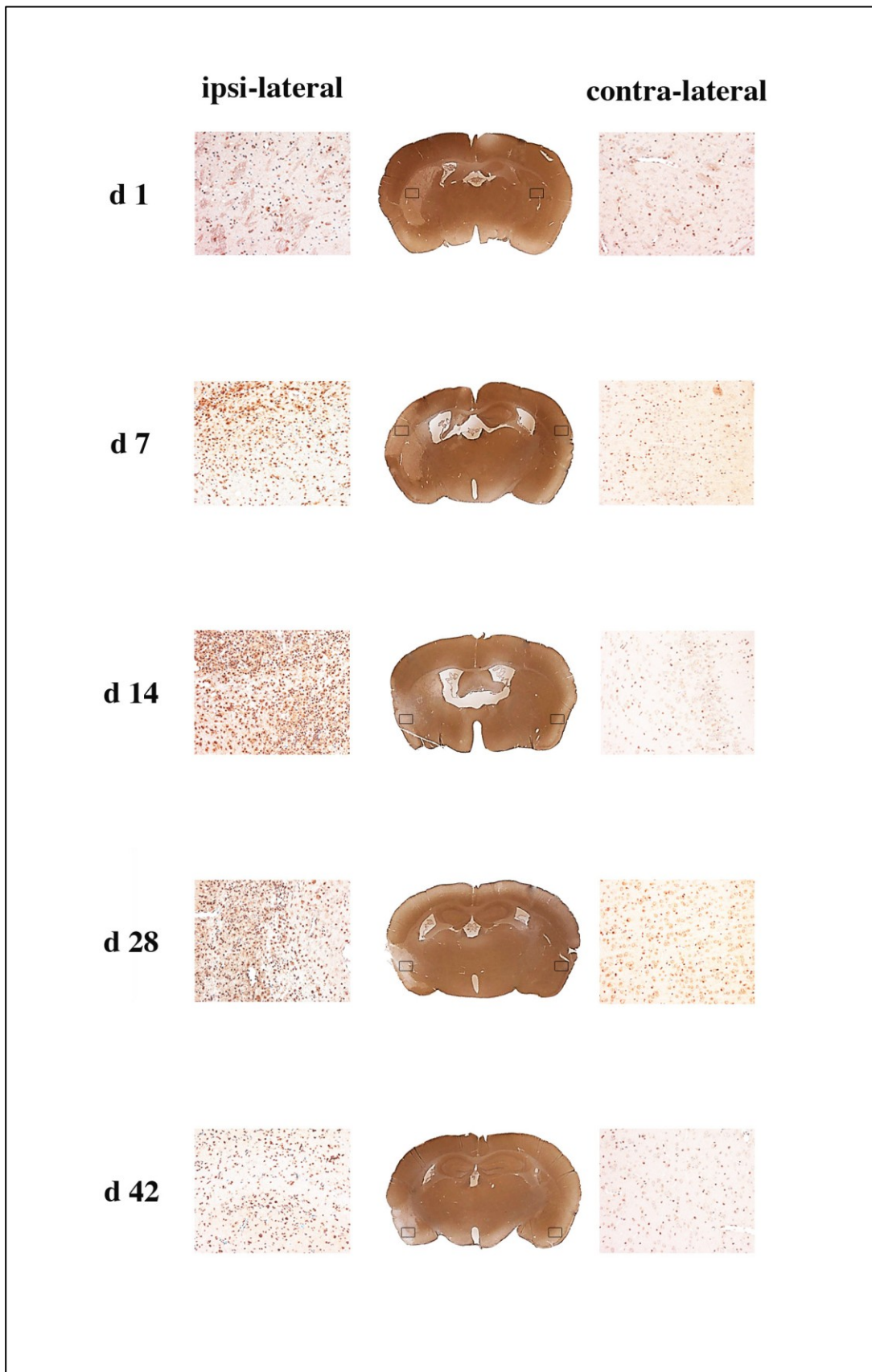


Abbildung 11: PRDX-1 Expression im Zeitverlauf (mittlere Reihe: Hirnquerschnitte mit Map-2 IHC; linke Seite: vergrößerte Ausschnitte der ischämischen Regionen; rechte Seite: vergrößerte Ausschnitte der kontra-lateralen Bereiche)

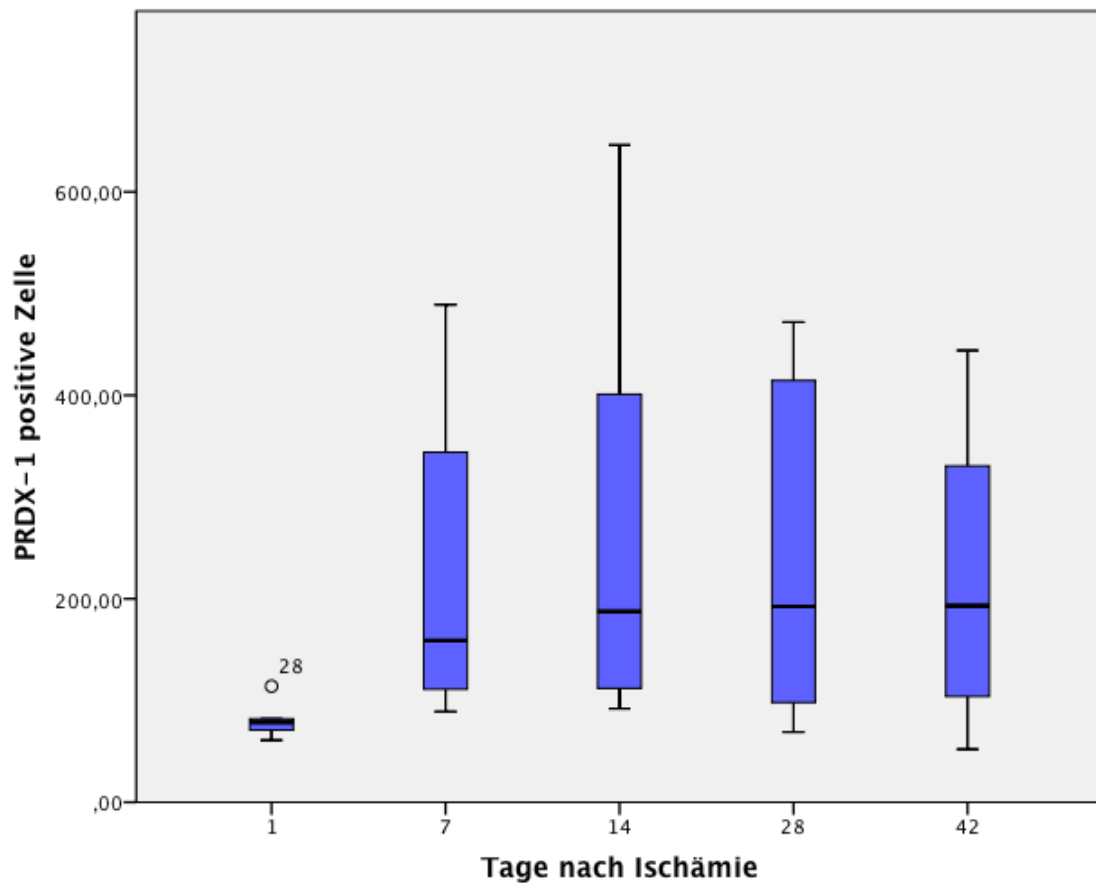


Abbildung 12: PRDX-1 positive Zellen im Zeitverlauf nach MCAO

	PRDX-1 positive Zellen		p
	MW (SD)		
	ipsi-lateral	contra-lateral	
d 1	76 (3)	86 (15)	0.571
d 7	331 (35)	112 (8)	<0.001
d 14	427 (64)	111 (6)	0.001
d 28	390 (47)	98 (12)	0.001
d 42	340 (30)	106 (14)	<0.001

Tabelle 11: PRDX-1 positive Zellen im Zeitverlauf nach MCAO

Als nächstes galt es, die zelluläre Lokalisation von PRDX-1 zu identifizieren. Hierfür wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen mit Anti-PRDX-1, Anti-Mac3, Anti-NeuN, Anti-GFAP und Anti-Olig-2 durchgeführt. Lichtmikroskopisch konnte eine Ko-Lokalisation von PRDX-1 mit Mac3 (siehe Abbildung 13 A) und mit Olig-2 (siehe Abbildung 14 A) im ischämischen Areal gefunden werden. Dieses Ergebnis konnte mittels Konfokalmikroskopie bestätigt werden (siehe Abbildung 13 D und Abbildung 14 D). Die Immunreaktivität der Oligodendrozyten deckt sich mit den von Goemaere und Knoop's publizierten Ergebnissen im gesunden adulten Maushirn. (Goemaere and Knoop's, 2011)

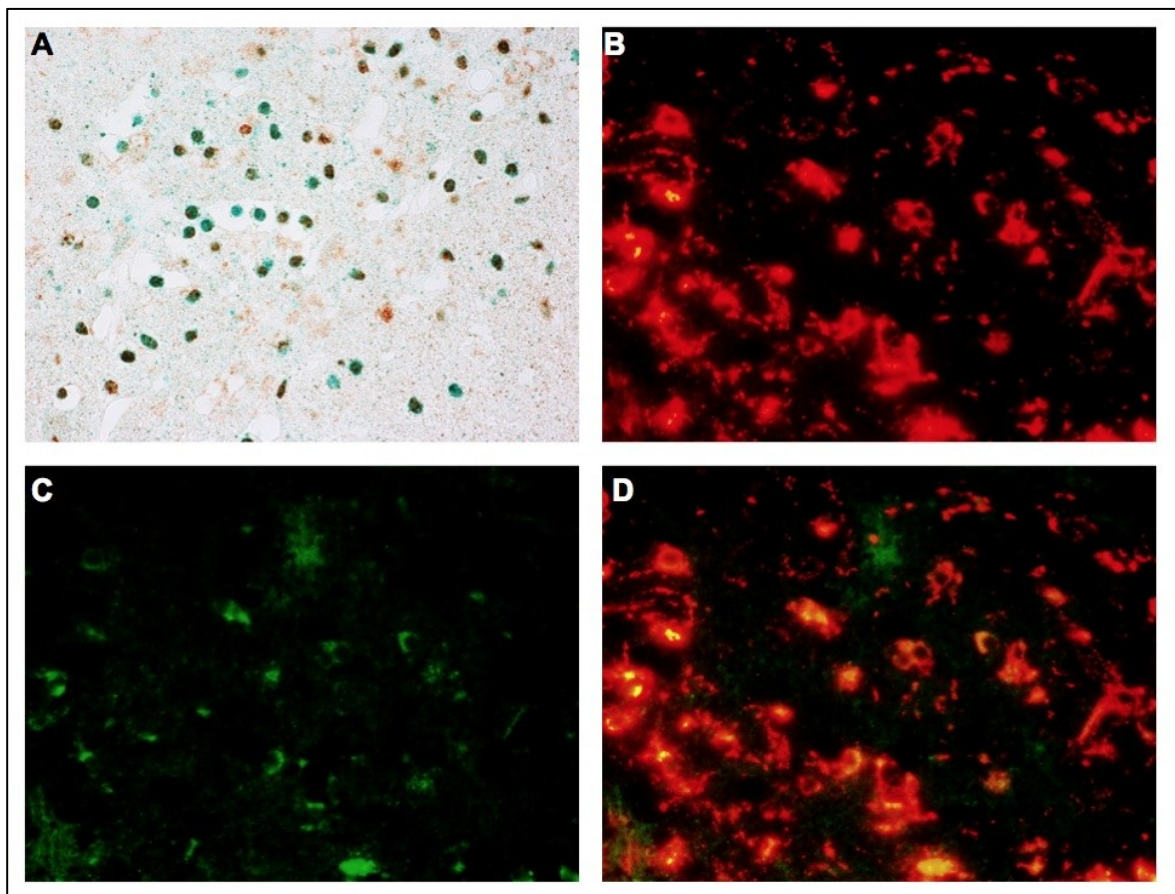


Abbildung 13: PRDX-1 und Mac3 Doppelmarkierung (A: PRDX-1 = braun, Mac3 = grün; B: Mac3; C: PRDX-1; D: B&C übereinandergelegt - gelb: Ko-Lokalisation) (Vergrößerung: A = 630fach; B-D = 1000fach)

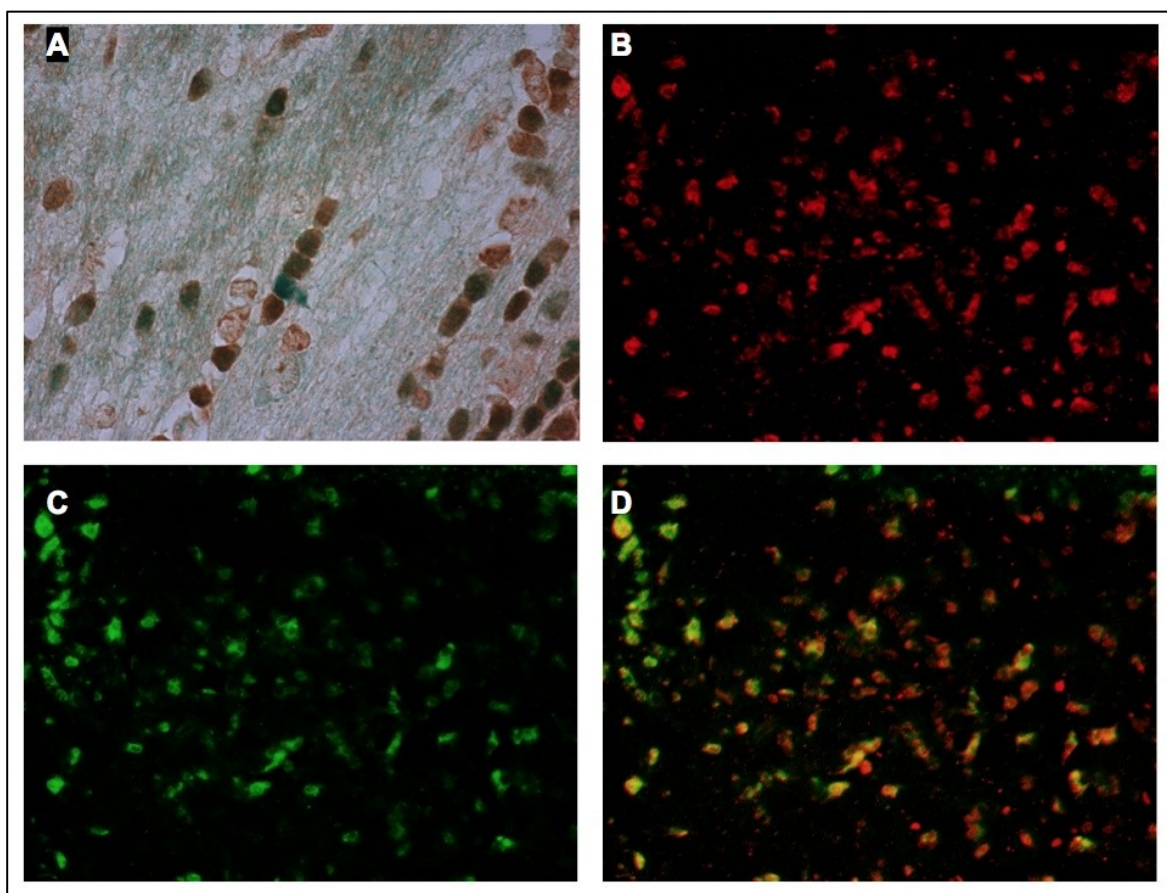


Abbildung 14: PRDX-1 und Olig-2 Doppelmarkierung (A: PRDX-1 = grün, Olig-2 = grün; B: Olig-2; C: PRDX-1; D: B&C übereinandergelegt - gelb: Ko-Lokalisation) (Vergrößerung: A = 1000fach; B-D = 630fach)

11 Diskussion

Der Schweregrad (NIHSS) des Schlaganfalls war in der untersuchten Studienkohorte höher als in anderen Studien, die sich mit potentiellen Outcomemarkern nach einem ischämischen Schlaganfall beschäftigt haben. (Katan et al., 2009, Katan et al., 2010) Dies ist auf die strengeren Einschluss- und Ausschlusskriterien zurückzuführen. Fast ein Drittel der inkludierten Patienten erhielt eine Thrombolyse-Therapie. Im Durchschnitt erhielten in den letzten Jahren nur 1/10 aller Patienten auf Stroke-Units in Österreich eine solche Therapie. (Ferrari et al., 2010) Dieser Unterschied spiegelt die Tatsache wieder, dass im Rahmen dieser Arbeit Patienten mit einem leichteren Schlaganfall oder einer TIA nicht eingeschlossen waren. Weiters ist anzumerken, dass es beim Patientenkollektiv im Vergleich zu anderen Studien (Emsley and Hopkins, 2008) zu einer höheren Rate von post-Stroke Infektionen gekommen ist. Dies ist höchstwahrscheinlich auch auf den durchschnittlich höheren NIHSS der Kohorte zurückzuführen.

11.1 Serologie Tag 0

Die erhöhten Plasmaspiegel von DKK-1 im Blutkreislauf von Schlaganfallpatienten die im Zuge dieser Arbeit festgestellt wurden, sind von unserer Arbeitsgruppe erstmalig in einer Publikation beschrieben worden. (Seifert-Held et al., 2011)

Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ist kein Rückschluss auf die zelluläre Quelle von DKK-1 möglich. In früheren Studien wurden Thrombozyten als Hauptquelle für den DKK-1 Spiegel im Blut beschrieben. (Ueland et al., 2009, Voorzanger-Rousselot et al., 2009) In diesen Studien wurde beschrieben, dass es in den Serum-Röhrchen nach der Blutabnahme während dem Gerinnungsvorgang zu einer Abgabe von DKK-1 gekommen ist. Diese Tatsache kann in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da die Messungen der Dkk-1 Konzentration im Plasma erfolgt ist. Eine DKK-1 Immunoreaktion konnte in aus der Karotis entnommenen Plaques nachgewiesen werden. (Ueland et al., 2009) Das Vorkommen von Karotis Stenosen und Okklusionen war bei den eingeschlossenen Patienten sowohl in der

Gruppe mit stabilen zerebrovaskulären Erkrankungen als auch bei den Schlaganfallpatienten gleichverteilt. Diese Patienten hatten keine höheren DKK-1 Spiegel als die Patienten, die kein solches Ereignis hatten. Somit kann ein Beitrag von Karotis-Stenosen zu den signifikant höheren DKK-1 Plasmaspiegeln von Schlaganfallpatienten ausgeschlossen werden

Auch ein Einfluss der Medikamente auf die gemessenen DKK-1 Werte kann ausgeschlossen werden. Ein solcher wurde zwar bei Patienten, die mit Atorvastatin behandelt worden sind beschrieben (Perez Castrillon et al., 2010, Sondergaard et al., 2009), da bei der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden konnte, kann ein Medikamenteneinfluss ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe der gemessenen Plasmakonzentration von DKK-1 bei Schlaganfallpatienten ist keine Prognose über das klinische Outcome möglich. Aufgrund der erzielten Ergebnisse kann von einem Zusammenhang von DKK-1 mit einer akuten Arterien Okklusion ausgegangen werden. Zu diesem Schluss sind auch Ueland et al. gekommen. (Ueland et al., 2009). Eine mögliche Therapieoption zur Eindämmung der zellulären Schäden nach einer Ischämie wäre der Einsatz von DKK-1 Antagonisten. Damit sollte es möglich sein, den durch die Blockierung des WNT-Signalweges durch DKK-1 getriggerten Zelltod einzudämmen. (Cappuccio et al., 2005)

Bezüglich MRP8/14 am Tag 0 konnten im Rahmen dieser Arbeit keine statistisch signifikanten Ergebnisse erlangt werden. Obwohl MRP8/14 eine große Rolle im Zuge von Entzündung und Immunantwort zugeschrieben wird (Nacken et al., 2003), zeigte sich keine Korrelationen zwischen den gemessenen Blutkonzentrationen und dem Auftreten von post-Schlaganfall Infektionen. Hauptgrund für einen nicht detektierbaren Effekt könnte die Tatsache sein, dass die Entzündungsreaktion nach einem ischämisch Infarkt erst zeitlich verzögert einsetzt. (Dirnagl et al., 1999) Aufgrund dieser Tatsache wurde die Konzentration von MRP8/14 auch im Plasma von Tag 7 gemessen.

Bezüglich PRDX-1 gibt es aus dem ersten Teil dieser Arbeit keine Ergebnisse. Dies liegt entweder an den nicht nachweisbaren Plasmakonzentrationen von PRDX-1 oder an einer mangelnden Sensitivität der verwendeten ELISA-Kits.

Letzteres kann jedoch höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden, da auch eine durchgeführte Western Blott Analyse keine sichtbaren Banden im Patientenblut gezeigt hat. (Daten hierzu wurden nicht in dieser Arbeit gezeigt) In der Literatur sind auch keine Studien zu finden, in denen die Konzentration von PRDX-1 im Plasma bestimmt worden ist. Entweder erfolgte die Messung dieser im Serum (Hoskins et al., 2011), in Zellkulturen (Goncalves et al., 2012, Yonglitthipagon et al., 2012), Gewebsflüssigkeiten (Hoskins et al., 2011) oder Hirn-Mikrodialysaten (Dayon et al., 2011).

11.2 Serologie Tag 7

Das Hinzufügen der am Tag 7 gemessenen NGAL Plasmaspiegel zu etablierten Prognosekriterien (NIHSS, Alter und Thrombolyse) verbessert die Vorhersage des Langzeit-Outcomes von Schlaganfallpatienten. Diese Tatsache konnte im Zuge dieser Arbeit erstmalig beschrieben werden. Trotzdem ist anzumerken, dass dieser Effekt verloren geht, wenn das Auftreten von post-Schlaganfall Infektionen ebenfalls in das Vorhersagemodell inkludiert wird.

Die Hauptrolle von NGAL wird in der Literatur bei Nierenerkrankungen gesehen, da es von den tubulären Nierenzellen als Antwort auf Verletzung gebildet wird. (Bolignano et al., 2010) Vor allem bei akutem Nierenversagen soll NGAL sehr gut als Biomarker geeignet sein. (Schiffli and Lang, 2012)

Über die Rolle von NGAL beim ischämischen Schlaganfall existieren noch keine Daten in der Literatur. Es wurden jedoch die neutrophilen Granulozyten als Hauptreservoir von NGAL beschrieben. (Xu et al., 1994, Kjeldsen et al., 1994) Außerdem zeigten die Ergebnisse anderer Arbeiten, dass Neuronen aktiv NGAL aufnehmen können (Ip et al., 2011) und NGAL bei entzündlichen Hirnerkrankungen Astrozytose induzieren kann. (Lee et al., 2009)

NGAL wird von neutrophilen Granulozyten in freier Form oder gebunden als Komplex mit MMP-9 sezerniert. (Xu et al., 1994, Kjeldsen et al., 1994) In dieser Arbeit wurde auch die Plasmakonzentration von MMP-9 am Tag 7 bestimmt. Die statistische Auswertung zeigte keine Korrelation mit dem Outcome am Tag 90. Es zeigten sich jedoch höherer MMP-9 Spiegel im Plasma von Patienten mit post-Stroke Infektionen. Patienten mit hämorrhagischen Transformationen wiesen im

Vergleich zu Patienten ohne solche Veränderungen keine Unterschiede in den MMP-9-Konzentrationen auf.

Im Laufe dieser Arbeit wurden noch weitere Proteine, die von neutrophilen Granulozyten sezerniert werden, untersucht. Weder MRP8/14 noch neutrophile Elastase korrelierte mit dem Schlaganfall-Outcome am Tag 90. Es konnte auch kein signifikanter Zusammenhang mit dem Auftreten von post-Schlaganfall Infektionen gefunden werden.

Bezüglich IL-6 konnte im Zuge dieser Arbeit kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kohorte mit gutem klinischen Outcome am Tag 90 und der Kohorte mit einem schlechten Outcome gefunden werden. Es war zwar eine signifikante Korrelation mit dem Auftreten von post-Stroke Infektionen vorhanden, diese ging jedoch im Zuge der Korrektur für multiples Testen verloren. Dieses Ergebnis ist konträr zu den Ergebnissen von anderen Studien, die einen signifikanten Anstieg der IL-6 Konzentrationen nach einem Infarkt zeigen. (Acalovschi et al., 2003, Fassbender et al., 1994, Ferrarese et al., 1999) Gründe dafür können sein, dass in dieser Arbeit die IL-6 Konzentration erst am Tag 7 nach dem Infarkt gemessen worden ist und Patienten mit evidenten Infektionen bei Symptombeginn ausgeschlossen worden sind. Es wurde nämlich beschrieben, dass das Niveau von IL-6 im Serum am Tag wieder auf das Ursprungsniveau zurückkehrt (Fassbender et al., 1994) und dass der Ausschluss von Patienten mit evidenten Infektionen zu einem Verlust der Signifikanz des Unterschiedes führt. (Emsley et al., 2003)

Die Quellen für die nach einer Ischämie erhöhte IL-6 Konzentration im peripheren Blutkreislauf sind noch unklar. Dass diese jedoch im Hirn selbst sein müssen, wird durch die positive Korrelation der IL-6 Konzentration und der Infarktgröße (Acalovschi et al., 2003) und einer beschriebenen höheren IL-6 Konzentration im Liquor als im Serum (Tarkowski et al., 1995) nahe gelegt.

Das Hauptergebnis in diesem Teil der Arbeit ist, dass die Plasmaspiegel von NGAL am Tag 7 in Zusammenhang mit einem schlechten klinischen Outcome bei Schlaganfallpatienten stehen; unabhängig von deren Alter, dem NIHSS bei Aufnahme und ob eine thrombolytische Therapie zur Anwendung kam. Außerdem

wiesen die NGAL-Konzentrationen eine stärkere Korrelation mit dem Auftreten von post-Schlaganfall Infektionen als IL-6 und CRP auf.

11.3 Tiermodell

Die durchgeführten Untersuchungen mit den MCAO Maushirnen haben die aufgestellte Hypothese, dass es in Folge eines ischämischen Infarktes zu einem Anstieg von PRDX-1 kommt, bestätigt. Das Ergebnis der Quantifizierung der positiven Zellen und des anschließend durchgeführten Zwei-Gruppen-Vergleich brachten einen statistisch eindeutig signifikanten Unterschied zwischen geschädigter und gesunder Hemisphäre hervor.

Die immunhistochemischen Färbungen mit Map-2 und Mac3 Antikörpern zeigten einerseits das durch die Ischämie geschädigte Areal und andererseits das Einwandern von Gewebsmakrophagen in dieses. Somit konnte sowohl der Erfolg der Fadenbehandlung der Mäuse bestätigt als auch der Ablauf der postischämischen Entzündungsreaktion sichergestellt werden.

Dieser Entzündungsreaktion nach einem Schlaganfall wurde in der Vergangenheit einerseits ein Beitrag an der Gewebsschädigung und andererseits eine schützende Wirkung zugeschrieben. (Iadecola and Anrather, 2011, Planas and Traystman, 2011) In einer aktuellen Arbeit werden speziell die Makrophagen als wichtiger Faktor für das Intakt-halten der neurovaskulären Einheit beschrieben. Außerdem raten die Autoren, dass im Zuge einer Schlaganfalltherapie von einem Angriff auf diese Zellen abgesehen werden sollte, da dies zu einer hämorrhagischen Transformation und in weiterer Folge zu einer Verschlechterung des klinischen Outcomes führen kann. (Gliem et al., 2012)

Die immunhistochemischen Färbungen mit Anti-PRDX-1 brachten sowohl eine Bioreaktivität in der ischämischen als auch in der nicht betroffenen Hemisphäre hervor. Da das Vorhandensein von PRDX-1 im gesunden Maushirn bereits beschrieben worden ist, konnte ein direkter Zusammenhang der am Tag 1 detektierten Aktivität mit dem ischämischen Vorfall ausgeschlossen werden. (Goemaere and Knoop, 2011, Jin et al., 2005) Dass es zu einem Anstieg von

PRDX-1 infolge eines Schlaganfalles kommt, zeigten die Färbungen der Hirne von Tieren, die erst 7 Tage oder später nach der MCAO getötet worden sind. Aufgrund früherer Studien, die gezeigt haben, dass Peroxiredoxine nach dem Gewebstod von den betroffenen Zellen in den extrazellulären Raum abgegeben werden, kann ein extrazerebraler Ursprung ausgeschlossen werden. (Chou et al., 2011, Dayon et al., 2011) Dies wird durch die aufgestellte Hypothese, dass Peroxiredoxine von nekrotischen Hirnzellen als Gefahrensignal in das extrazelluläre Kompartiment abgegeben werden, in einer aktuellen Arbeit untermauert. (Shichita et al., 2012)

Die Quantifizierung der PRDX-1 positiven Zellen brachte auch einen leichten Anstieg dieser in der gesunden Hemisphäre hervor. Ein Grund dafür könnte die Diffusion kleiner Mengen an PRDX-1 in die kontralaterale Hemisphäre oder eine zelluläre Sekretion geschädigter Zellen, verursacht durch eine Raumforderung der ischämischen Hemisphäre, sein.

Die Ergebnisse der durchgeführten Doppelmarkierungen zeigten eine Ko-Lokalisation von PRDX-1 mit Oligodendrozyten im nicht von ischämischer Schädigung betroffenen Areal. Diese Beobachtung deckt sich mit denen von zwei anderen Gruppen. (Goemaere and Knoops, 2011, Jin et al., 2005)

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit auch eine Ko-Lokalisation im geschädigten Bereich nachgewiesen werden. Astrozyten und Neurone zeigten keine Reaktivität mit PRDX-1.

Darüber hinaus konnte ergänzend zu zuvor erwähnten Publikationen im Zuge dieser Arbeit eine Ko-Lokalisation von Mac3 positiven Zellen, welche im gesunden Hirn nicht vorkommen, mit PRDX-1 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestärkt einerseits die von Shichita aufgestellte Hypothese und lässt andererseits eine Präzisierung dieser mit dem zellulären Ziel des Gefahrensignals zu. Mit den Beobachtungen von Neumann et al., dass aktivierte Makrophagen Neuronen schützen, indem sie eindringende Granulozyten direkt attackieren (Neumann et al., 2008), könnte die Hypothese finalisiert werden. Dies würde auch erklären, warum es bei PRDX-1 Knockout-Mäusen zu einer Vergrößerung des geschädigten Bereiches nach einem ischämischen Infarkt kommt. Diese konstruierte Hypothese dürfte jedoch nur für PRDX-1 gelten, da in der selben Studie ein therapeutischer Effekt nach Verabreichung eines Anti- Peroxiredoxin Cocktails nachgewiesen werden konnte. (Shichita et al., 2012)

In verschiedenen Studien wurde bereits die therapeutische Wirksamkeit von anti-inflammatorischen oder immunmodulierenden Behandlungen bewiesen. (Zhang et al., 1995, Yrjanheikki et al., 1999, Frenkel et al., 2003) Versuche diese Ergebnisse in die klinische Routine zu überführen sind jedoch gescheitert. (2001) Als Gründe hierfür werden von Jander et al. die Heterogenität der unterschiedlichen Pathomechanismen und die unterschiedlichen Zeitfenster angeführt. (Jander et al., 2007) Außerdem gilt zu bedenken, dass eine solche Therapie auch Nachteile mit sich bringen kann, da das Unterdrücken der Entzündungsreaktion auch die Möglichkeit der Selbstreparatur einschränken kann. (Iadecola and Anrather, 2011) Deshalb gilt es in der Evaluation der therapeutischen Eignung der Blockade des PRDX-Signalweges noch zu prüfen ob der eingesetzte Antikörper nur das extrazelluläre PRDX bindet oder auch das intrazelluläre PRDX erreicht und dadurch die zelleigene Schutzfunktion außer Kraft setzt. (Gan et al., 2012) Weiters sollte eine Charakterisierung des Schutzmechanismus anhand der etablierten Kriterien für die vorklinische Schlaganfallforschung erfolgen. (Albers et al., 2011)

12 Literatur

2001. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. *Neurology*, 57, 1428-34.
- ACALOVSKI, D., WIEST, T., HARTMANN, M., FARAHMI, M., MANSMANN, U., AUFFARTH, G. U., GRAU, A. J., GREEN, F. R., GROND-GINSBACH, C. & SCHWANINGER, M. 2003. Multiple levels of regulation of the interleukin-6 system in stroke. *Stroke*, 34, 1864-9.
- ACARIN, L., GONZALEZ, B. & CASTELLANO, B. 2000. Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur J Neurosci*, 12, 3505-20.
- ADACHI, T., FUKUSHIMA, T., USAMI, Y. & HIRANO, K. 1993. Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *Biochem J*, 289 (Pt 2), 523-7.
- ALBERS, G. W., GOLDSTEIN, L. B., HESS, D. C., WECHSLER, L. R., FURIE, K. L., GORELICK, P. B., HURN, P., LIEBESKIND, D. S., NOGUEIRA, R. G. & SAVER, J. L. 2011. Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies. *Stroke*, 42, 2645-50.
- ALI, C., NICOLE, O., DOCAGNE, F., LESNE, S., MACKENZIE, E. T., NOUVELOT, A., BUISSON, A. & VIVIEN, D. 2000. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20, 956-66.
- ALLEN, C. L. & BAYRAKTUTAN, U. 2009. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke*, 4, 461-70.
- ALTWEGG, L. A., NEIDHART, M., HERSBERGER, M., MULLER, S., EBERLI, F. R., CORTI, R., ROFFI, M., SUTSCH, G., GAY, S., VON ECKARDSTEIN, A., WISCHNEWSKY, M. B., LUSCHER, T. F. & MAIER, W. 2007. Myeloid-related protein 8/14 complex is released by monocytes and granulocytes at the site of coronary occlusion: a

- novel, early, and sensitive marker of acute coronary syndromes. *Eur Heart J*, 28, 941-8.
- AMANTEA, D., NAPPI, G., BERNARDI, G., BAGETTA, G. & CORASANITI, M. T. 2009. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J*, 276, 13-26.
- ARSAVA, E. M., BALLABIO, E., BENNER, T., COLE, J. W., DELGADO-MARTINEZ, M. P., DICHGANS, M., FAZEKAS, F., FURIE, K. L., ILLOH, K., JOOD, K., KITNER, S., LINDGREN, A. G., MAJERSIK, J. J., MACLEOD, M. J., MEURER, W. J., MONTANER, J., OLUGBODI, A. A., PASDAR, A., REDFORS, P., SCHMIDT, R., SHARMA, P., SINGHAL, A. B., SORENSEN, A. G., SUDLOW, C., THIJS, V., WORRALL, B. B., ROSAND, J. & AY, H. 2010. The Causative Classification of Stroke system: an international reliability and optimization study. *Neurology*, 75, 1277-84.
- ASTRUP, J., SIESJO, B. K. & SYMON, L. 1981. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*, 12, 723-5.
- AY, H., BENNER, T., ARSAVA, E. M., FURIE, K. L., SINGHAL, A. B., JENSEN, M. B., AYATA, C., TOWFIGHI, A., SMITH, E. E., CHONG, J. Y., KOROSHETZ, W. J. & SORENSEN, A. G. 2007. A computerized algorithm for etiologic classification of ischemic stroke: the Causative Classification of Stroke System. *Stroke*, 38, 2979-84.
- BAJAJ, A., SCHERNHAMMER, E. S., HAIDINGER, G. & WALDHOR, T. 2010. Trends in mortality from stroke in Austria, 1980-2008. *Wien Klin Wochenschr*, 122, 346-53.
- BAMFORD, J., SANDERCOCK, P., DENNIS, M., BURN, J. & WARLOW, C. 1991. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet*, 337, 1521-6.
- BARONE, F. C., ARVIN, B., WHITE, R. F., MILLER, A., WEBB, C. L., WILLETTE, R. N., LYSKO, P. G. & FEUERSTEIN, G. Z. 1997. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke*, 28, 1233-44.
- BEDNAR, M. M., RAYMOND, S., MCAULIFFE, T., LODGE, P. A. & GROSS, C. E. 1991. The role of neutrophils and platelets in a rabbit model of thromboembolic stroke. *Stroke*, 22, 44-50.

- BERGERON, L. & YUAN, J. 1998. Sealing one's fate: control of cell death in neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 8, 55-63.
- BERGGREN, M. I., HUSBECK, B., SAMULITIS, B., BAKER, A. F., GALLEGOS, A. & POWIS, G. 2001. Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Arch Biochem Biophys*, 392, 103-9.
- BHARDWAJ, R. S., ZOTZ, C., ZWADLO-KLARWASSER, G., ROTH, J., GOEBELER, M., MAHNKE, K., FALK, M., MEINARDUS-HAGER, G. & SORG, C. 1992. The calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 form a membrane-associated heterodimer in a subset of monocytes/macrophages present in acute but absent in chronic inflammatory lesions. *Eur J Immunol*, 22, 1891-7.
- BOLIGNANO, D., COPPOLINO, G., LACQUANITI, A. & BUEMI, M. 2010. From kidney to cardiovascular diseases: NGAL as a biomarker beyond the confines of nephrology. *Eur J Clin Invest*, 40, 273-6.
- BOUSSAC, M. & GARIN, J. 2000. Calcium-dependent secretion in human neutrophils: a proteomic approach. *Electrophoresis*, 21, 665-72.
- BRAININ, M., DACHENHAUSEN, A. & STEINER, M. 2003. [Epidemiology of stroke]. *Wien Med Wochenschr*, 153, 3-5.
- BRATT, T. 2000. Lipocalins and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 318-26.
- BROTT, T., ADAMS, H. P., JR., OLINGER, C. P., MARLER, J. R., BARSAN, W. G., BILLER, J., SPILKER, J., HOLLERAN, R., EBERLE, R., HERTZBERG, V. & ET AL. 1989. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke*, 20, 864-70.
- BUSCETI, C. L., BIAGIONI, F., ARONICA, E., RIOZZI, B., STORTO, M., BATTAGLIA, G., GIORGI, F. S., GRADINI, R., FORNAI, F., CARICASOLE, A., NICOLETTI, F. & BRUNO, V. 2007. Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 48, 694-705.

- CAMPBELL, I. L., ABRAHAM, C. R., MASLIAH, E., KEMPER, P., INGLIS, J. D., OLDSTONE, M. B. & MUCKE, L. 1993. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10061-5.
- CAPPUCCIO, I., CALDERONE, A., BUSCETI, C. L., BIAGIONI, F., PONTARELLI, F., BRUNO, V., STORTO, M., TERSTAPPEN, G. T., GAVIRAGHI, G., FORNAI, F., BATTAGLIA, G., MELCHIORRI, D., ZUKIN, R. S., NICOLETTI, F. & CARICASOLE, A. 2005. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death. *J Neurosci*, 25, 2647-57.
- CARICASOLE, A., COPANI, A., CARACI, F., ARONICA, E., ROZEMULLER, A. J., CARUSO, A., STORTO, M., GAVIRAGHI, G., TERSTAPPEN, G. C. & NICOLETTI, F. 2004. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J Neurosci*, 24, 6021-7.
- CEULEMANS, A. G., ZGAVC, T., KOOIJMAN, R., HACHIMI-IDRISSI, S., SARRE, S. & MICHOTTE, Y. 2010. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. *J Neuroinflammation*, 7, 74.
- CHAMORRO, M. N., SCHWARTZ, D. R., VONICA, A., BRIVANLOU, A. H., CHO, K. R. & VARMUS, H. E. 2005. FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J*, 24, 73-84.
- CHANG, D. I., HOSOMI, N., LUCERO, J., HEO, J. H., ABUMIYA, T., MAZAR, A. P. & DEL ZOPPO, G. J. 2003. Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 1408-19.
- CHOPP, M., ZHANG, R. L., CHEN, H., LI, Y., JIANG, N. & RUSCHE, J. R. 1994. Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 25, 869-75; discussion 875-6.

- CHOU, J. L., WU, C. H., TSAI, C. Y., CHANG, A. Y. & CHAN, S. H. 2011. Proteomic investigation of a neural substrate intimately related to brain death. *Proteomics*, 11, 239-48.
- COWLAND, J. B., SORENSEN, O. E., SEHESTED, M. & BORREGAARD, N. 2003. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *J Immunol*, 171, 6630-9.
- CROCE, K., GAO, H., WANG, Y., MOOROKA, T., SAKUMA, M., SHI, C., SUKHOVA, G. K., PACKARD, R. R., HOGG, N., LIBBY, P. & SIMON, D. I. 2009. Myeloid-related protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation*, 120, 427-36.
- CUI, J., JIANG, W., WANG, S., WANG, L. & XIE, K. 2012. Role of Wnt/beta-catenin Signaling in Drug Resistance of Pancreatic Cancer. *Curr Pharm Des*, 18, 2464-71.
- DALE, I., FAGERHOL, M. K. & NAESGAARD, I. 1983. Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *Eur J Biochem*, 134, 1-6.
- DALE, T. C. 1998. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J*, 329 (Pt 2), 209-23.
- DAMMEYER, P. & ARNER, E. S. 2011. Human Protein Atlas of redox systems - what can be learnt? *Biochim Biophys Acta*, 1810, 111-38.
- DAWSON, D. A. & HALLENBECK, J. M. 1996. Acute focal ischemia-induced alterations in MAP2 immunostaining: description of temporal changes and utilization as a marker for volumetric assessment of acute brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16, 170-4.
- DAYON, L., TURCK, N., GARCI-BERROCOSO, T., WALTER, N., BURKHARD, P. R., VILALTA, A., SAHUQUILLO, J., MONTANER, J. & SANCHEZ, J. C. 2011. Brain extracellular fluid protein changes in acute stroke patients. *J Proteome Res*, 10, 1043-51.
- DE FERRARI, G. V., CHACON, M. A., BARRIA, M. I., GARRIDO, J. L., GODOY, J. A., OLIVARES, G., REYES, A. E., ALVAREZ, A., BRONFMAN, M. & INESTROSA, N. C.

2003. Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by beta-amyloid fibrils. *Mol Psychiatry*, 8, 195-208.
- DEB, P., SHARMA, S. & HASSAN, K. M. 2010. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology*, 17, 197-218.
- DELONG, E. R., DELONG, D. M. & CLARKE-PEARSON, D. L. 1988. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*, 44, 837-45.
- DEVIREDDY, L. R., GAZIN, C., ZHU, X. & GREEN, M. R. 2005. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*, 123, 1293-305.
- DEVIREDDY, L. R., TEODORO, J. G., RICHARD, F. A. & GREEN, M. R. 2001. Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science*, 293, 829-34.
- DIEP, D. B., HOEN, N., BACKMAN, M., MACHON, O. & KRAUSS, S. 2004. Characterisation of the Wnt antagonists and their response to conditionally activated Wnt signalling in the developing mouse forebrain. *Brain Res Dev Brain Res*, 153, 261-70.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M. A. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22, 391-7.
- DIRNAGL, U., KLEHMET, J., BRAUN, J. S., HARMS, H., MEISEL, C., ZIEMSEN, T., PRASS, K. & MEISEL, A. 2007. Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke*, 38, 770-3.
- EDGEWORTH, J., GORMAN, M., BENNETT, R., FREEMONT, P. & HOGG, N. 1991. Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *J Biol Chem*, 266, 7706-13.
- EGLER, R. A., FERNANDES, E., ROTHERMUND, K., SEREIKA, S., DE SOUZA-PINTO, N., JARUGA, P., DIZDAROGLU, M. & PROCHOWNIK, E. V. 2005. Regulation of reactive oxygen species, DNA damage, and c-Myc function by peroxiredoxin 1. *Oncogene*, 24, 8038-50.

- ELNEIHOUM, A. M., FALKE, P., AXELSSON, L., LUNDBERG, E., LINDGARDE, F. & OHLSSON, K. 1996. Leukocyte activation detected by increased plasma levels of inflammatory mediators in patients with ischemic cerebrovascular diseases. *Stroke*, 27, 1734-8.
- EMBER, J. A., DEL ZOPPO, G. J., MORI, E., THOMAS, W. S., COPELAND, B. R. & HUGLI, T. E. 1994. Polymorphonuclear leukocyte behavior in a nonhuman primate focal ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14, 1046-54.
- EMSLEY, H. C. & HOPKINS, S. J. 2008. Acute ischaemic stroke and infection: recent and emerging concepts. *Lancet Neurol*, 7, 341-53.
- EMSLEY, H. C., SMITH, C. J., GAVIN, C. M., GEORGIU, R. F., VAIL, A., BARBERAN, E. M., HALLENBECK, J. M., DEL ZOPPO, G. J., ROTHWELL, N. J., TYRRELL, P. J. & HOPKINS, S. J. 2003. An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol*, 139, 93-101.
- FASSBENDER, K., SCHMIDT, R., MOSSNER, R., DAFFERTSHOFER, M. & HENNERICI, M. 1994. Pattern of activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in acute stroke. Relation to acute confusional state, extent of brain damage, and clinical outcome. *Stroke*, 25, 1105-8.
- FASSETT, R. G., ROBERTSON, I. K., BALL, M. J., GERAGHTY, D. P., CARDINAL, J. W. & COOMBES, J. S. 2011. Effects of atorvastatin on NGAL and cystatin C in chronic kidney disease: a post hoc analysis of the LORD trial. *Nephrol Dial Transplant*.
- FERRARESE, C., MASCARUCCI, P., ZOIA, C., CAVARRETTA, R., FRIGO, M., BEGNI, B., SARINELLA, F., FRATTOLA, L. & DE SIMONI, M. G. 1999. Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19, 1004-9.
- FERRARI, J., KNOFLACH, M., KIECHL, S., WILLEIT, J., MATOSEVIC, B., SEYFANG, L. & LANG, W. 2010. Stroke thrombolysis: having more time translates into delayed therapy: data from the Austrian Stroke Unit Registry. *Stroke*, 41, 2001-4.
- FEUERSTEIN, G. Z., WANG, Z. & BARONE, F. C. 1998. In: GINSBERG, M. & BOGOUSSLAVSKY, J. (eds.) *Cerebrovascular Disease: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Wiley-Blackwell.

- FLO, T. H., SMITH, K. D., SATO, S., RODRIGUEZ, D. J., HOLMES, M. A., STRONG, R. K., AKIRA, S. & ADEREM, A. 2004. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*, 432, 917-21.
- FLOWER, D. R. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 318 (Pt 1), 1-14.
- FLURI, F. & LYRRER, P. 2008. Hirnschlag und Stroke-Units. *Ars Medici*, 4.
- FOELL, D., FROSCHE, M., SORG, C. & ROTH, J. 2004. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin Chim Acta*, 344, 37-51.
- FRENKEL, D., HUANG, Z., MARON, R., KOLDZIC, D. N., HANCOCK, W. W., MOSKOWITZ, M. A. & WEINER, H. L. 2003. Nasal vaccination with myelin oligodendrocyte glycoprotein reduces stroke size by inducing IL-10-producing CD4+ T cells. *J Immunol*, 171, 6549-55.
- FUKUDA, S., FINI, C. A., MABUCHI, T., KOZIOL, J. A., EGGLESTON, L. L., JR. & DEL ZOPPO, G. J. 2004. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke*, 35, 998-1004.
- GABAY, J. E., SCOTT, R. W., CAMPANELLI, D., GRIFFITH, J., WILDE, C., MARRA, M. N., SEEGER, M. & NATHAN, C. F. 1989. Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 5610-4.
- GAN, Y., JI, X., HU, X., LUO, Y., ZHANG, L., LI, P., LIU, X., YAN, F., VOSLER, P., GAO, Y., STETLER, R. A. & CHEN, J. 2012. Transgenic Overexpression of Peroxiredoxin-2 Attenuates Ischemic Neuronal Injury Via Suppression of a Redox-Sensitive Pro-Death Signaling Pathway. *Antioxid Redox Signal*.
- GERTZ, K., KRONENBERG, G., KALIN, R. E., BALDINGER, T., WERNER, C., BALKAYA, M., EOM, G. D., HELLMANN-REGEN, J., KROBER, J., MILLER, K. R., LINDAUER, U., LAUFS, U., DIRNAGL, U., HEPPNER, F. L. & ENDRES, M. 2012. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. *Brain*.
- GIDDAY, J. M., GASCHÉ, Y. G., COPIN, J. C., SHAH, A. R., PEREZ, R. S., SHAPIRO, S. D., CHAN, P. H. & PARK, T. S. 2005. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after

- transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289, H558-68.
- GLIEM, M., MAUSBERG, A. K., LEE, J. I., SIMIANTONAKIS, I., VAN ROOIJEN, N., HARTUNG, H. P. & JANDER, S. 2012. Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models. *Ann Neurol*, 71, 743-52.
- GLINKA, A., WU, W., DELIUS, H., MONAGHAN, A. P., BLUMENSTOCK, C. & NIEHRS, C. 1998. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 391, 357-62.
- GOEMAERE, J. & KNOOPS, B. 2011. Peroxiredoxin distribution in the mouse brain with emphasis on neuronal populations affected in neurodegenerative disorders. *J Comp Neurol*.
- GOETZ, D. H., HOLMES, M. A., BORREGAARD, N., BLUHM, M. E., RAYMOND, K. N. & STRONG, R. K. 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*, 10, 1033-43.
- GONCALVES, K., SULLIVAN, K. & PHELAN, S. 2012. Differential expression and function of peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 6 in cancerous MCF-7 and noncancerous MCF-10A breast epithelial cells. *Cancer Invest*, 30, 38-47.
- GONZALEZ-SANCHO, J. M., AGUILERA, O., GARCIA, J. M., PENDAS-FRANCO, N., PENA, C., CAL, S., GARCIA DE HERREROS, A., BONILLA, F. & MUNOZ, A. 2005. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene*, 24, 1098-103.
- GORBACHEVA, F. E. & NATIAZHKINA, G. M. 1983. [Hemorrhagic stroke]. *Feldsher Akush*, 48, 37-41.
- GRAU, A. J., SEITZ, R., IMMEL, A., STEICHEN-WIEHN, C. & HACKE, W. 1995. Increased Levels of Leukocyte Elastase in Ischemic Stroke and in Subjects with Vascular Risk Factors. *Cerebrovascular Diseases*, 5, 50-54.
- GREEN, D. R. & KROEMER, G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305, 626-9.

- GU, Z., KAUL, M., YAN, B., KRIDEL, S. J., CUI, J., STRONGIN, A., SMITH, J. W., LIDDINGTON, R. C. & LIPTON, S. A. 2002. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science*, 297, 1186-90.
- GUO, Q., HUANG, X., ZHANG, J., LUO, Y., PENG, Z. & LI, S. 2011. Downregulation of Peroxiredoxin I by a Novel Fully Human Phage Display Recombinant Antibody Induces Apoptosis and Enhances Radiation Sensitization in A549 Lung Carcinoma Cells. *Cancer Biother Radiopharm*.
- HA, B., KIM, E. K., KIM, J. H., LEE, H. N., LEE, K. O., LEE, S. Y. & JANG, H. H. 2012. Human peroxiredoxin 1 modulates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition through its peroxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 421, 33-7.
- HACKE, W., ALBERS, G., AL-RAWI, Y., BOGOUSSLAVSKY, J., DAVALOS, A., ELIASZIW, M., FISCHER, M., FURLAN, A., KASTE, M., LEES, K. R., SOEHNGEN, M. & WARACH, S. 2005. The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS): a phase II MRI-based 9-hour window acute stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase. *Stroke*, 36, 66-73.
- HACKE, W., DONNAN, G., FIESCHI, C., KASTE, M., VON KUMMER, R., BRODERICK, J. P., BROTT, T., FRANKEL, M., GROTTA, J. C., HALEY, E. C., JR., KWIATKOWSKI, T., LEVINE, S. R., LEWANDOWSKI, C., LU, M., LYDEN, P., MARLER, J. R., PATEL, S., TILLEY, B. C., ALBERS, G., BLUHMKI, E., WILHELM, M. & HAMILTON, S. 2004. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet*, 363, 768-74.
- HALLENBECK, J. M. 2002. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med*, 8, 1363-8.
- HEALY, A. M., PICKARD, M. D., PRADHAN, A. D., WANG, Y., CHEN, Z., CROCE, K., SAKUMA, M., SHI, C., ZAGO, A. C., GARASIC, J., DAMOKOSH, A. I., DOWIE, T. L., POISSON, L., LILLIE, J., LIBBY, P., RIDKER, P. M. & SIMON, D. I. 2006. Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. *Circulation*, 113, 2278-84.

- HORSTMANN, S., KALB, P., KOZIOL, J., GARDNER, H. & WAGNER, S. 2003. Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke*, 34, 2165-70.
- HOSKINS, E. R., HOOD, B. L., SUN, M., KRIVAK, T. C., EDWARDS, R. P. & CONRADS, T. P. 2011. Proteomic analysis of ovarian cancer proximal fluids: validation of elevated peroxiredoxin 1 in patient peripheral circulation. *PLoS One*, 6, e25056.
- HUANG, J., UPADHYAY, U. M. & TAMARGO, R. J. 2006. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol*, 66, 232-45.
- IADECOLA, C. & ANRATHER, J. 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*, 17, 796-808.
- IKEGAME, Y., YAMASHITA, K., HAYASHI, S., YOSHIMURA, S., NAKASHIMA, S. & IWAMA, T. 2010. Neutrophil elastase inhibitor prevents ischemic brain damage via reduction of vasogenic edema. *Hypertens Res*, 33, 703-7.
- IONITA, M. G., CATANZARITI, L. M., BOTS, M. L., DE VRIES, J. P., MOLL, F. L., KWAN SZE, S., PASTERKAMP, G. & DE KLEIJN, D. P. 2010. High myeloid-related protein: 8/14 levels are related to an increased risk of cardiovascular events after carotid endarterectomy. *Stroke*, 41, 2010-5.
- IP, J. P., NOCON, A. L., HOFER, M. J., LIM, S. L., MULLER, M. & CAMPBELL, I. L. 2011. Lipocalin 2 in the central nervous system host response to systemic lipopolysaccharide administration. *J Neuroinflammation*, 8, 124.
- ISHII, T., YAMADA, M., SATO, H., MATSUE, M., TAKETANI, S., NAKAYAMA, K., SUGITA, Y. & BANNAI, S. 1993. Cloning and characterization of a 23-kDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein. *J Biol Chem*, 268, 18633-6.
- IWATSUKI, K., KUMURA, E., YOSHIMINE, T., YAMAMOTO, K., SATO, M. & HAYAKAWA, T. 1998. Increase in jugular levels of polymorphonuclear neutrophil elastase in patients with acute cerebral infarction. *Neurol Res*, 20, 397-402.
- JANDER, S., SCHROETER, M. & SALEH, A. 2007. Imaging inflammation in acute brain ischemia. *Stroke*, 38, 642-5.

- JANSSEN, P. M., VISSER, N. A., DORHOUT MEES, S. M., KLIJN, C. J., ALGRA, A. & RINKEL, G. J. 2010. Comparison of telephone and face-to-face assessment of the modified Rankin Scale. *Cerebrovasc Dis*, 29, 137-9.
- JIN, M. H., LEE, Y. H., KIM, J. M., SUN, H. N., MOON, E. Y., SHONG, M. H., KIM, S. U., LEE, S. H., LEE, T. H., YU, D. Y. & LEE, D. S. 2005. Characterization of neural cell types expressing peroxiredoxins in mouse brain. *Neurosci Lett*, 381, 252-7.
- JIN, R., YANG, G. & LI, G. 2010. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*, 87, 779-89.
- KAMMERSGAARD, L. P., JORGENSEN, H. S., NAKAYAMA, H., REITH, J., RAASCHOU, H. O. & OLSEN, T. S. 1999. Leukocytosis in acute stroke: relation to initial stroke severity, infarct size, and outcome: the Copenhagen Stroke Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 8, 259-63.
- KATAN, M., FLURI, F., MORGENTHALER, N. G., SCHUETZ, P., ZWEIFEL, C., BINGISSER, R., MULLER, K., MECKEL, S., GASS, A., KAPPOS, L., STECK, A. J., ENGELTER, S. T., MULLER, B. & CHRIST-CRAIN, M. 2009. Copeptin: a novel, independent prognostic marker in patients with ischemic stroke. *Ann Neurol*, 66, 799-808.
- KATAN, M., FLURI, F., SCHUETZ, P., MORGENTHALER, N. G., ZWEIFEL, C., BINGISSER, R., KAPPOS, L., STECK, A., ENGELTER, S. T., MULLER, B. & CHRIST-CRAIN, M. 2010. Midregional pro-atrial natriuretic peptide and outcome in patients with acute ischemic stroke. *J Am Coll Cardiol*, 56, 1045-53.
- KATSURA, K., KRISTIAN, T. & SIESJO, B. K. 1994. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans*, 22, 991-6.
- KAWANO, Y. & KYPTA, R. 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*, 116, 2627-34.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KIM, J. S. 1996. Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci*, 137, 69-78.

- KIM, S. Y., KIM, T. J. & LEE, K. Y. 2008. A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated signaling pathway. *FEBS Lett*, 582, 1913-8.
- KITAGAWA, K., MATSUMOTO, M., NIINOBE, M., MIKOSHIBA, K., HATA, R., UEDA, H., HANDA, N., FUKUNAGA, R., ISAKA, Y., KIMURA, K. & ET AL. 1989. Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage--immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience*, 31, 401-11.
- KJELDEN, L., BAINTON, D. F., SENGELOV, H. & BORREGAARD, N. 1994. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood*, 83, 799-807.
- KRIZANAC-BENGEZ, L., KAPURAL, M., PARKINSON, F., CUCULLO, L., HOSSAIN, M., MAYBERG, M. R. & JANIGRO, D. 2003. Effects of transient loss of shear stress on blood-brain barrier endothelium: role of nitric oxide and IL-6. *Brain Res*, 977, 239-46.
- KUROIWA, T., TING, P., MARTINEZ, H. & KLATZO, I. 1985. The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol*, 68, 122-9.
- LALANCETTE-HEBERT, M., GOWING, G., SIMARD, A., WENG, Y. C. & KRIZ, J. 2007. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci*, 27, 2596-605.
- LANG, W. 2009. [Challenges in acute stroke]. *Wien Klin Wochenschr*, 121, 729-31.
- LEE, S., LEE, J., KIM, S., PARK, J. Y., LEE, W. H., MORI, K., KIM, S. H., KIM, I. K. & SUK, K. 2007. A dual role of lipocalin 2 in the apoptosis and deramification of activated microglia. *J Immunol*, 179, 3231-41.
- LEE, S., PARK, J. Y., LEE, W. H., KIM, H., PARK, H. C., MORI, K. & SUK, K. 2009. Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrocytosis. *J Neurosci*, 29, 234-49.
- LEGOS, J. J., WHITMORE, R. G., ERHARDT, J. A., PARSONS, A. A., TUMA, R. F. & BARONE, F. C. 2000. Quantitative changes in interleukin proteins following focal stroke in the rat. *Neurosci Lett*, 282, 189-92.

- LEIST, M. & NICOTERA, P. 1998. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res*, 239, 183-201.
- LEITNER, B. 2011. *Jahrbuch der Gesundheitsstatistik 2010*, Wien, Statistik Austria.
- LIPTON, S. A. & ROSENBERG, P. A. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*, 330, 613-22.
- LIU, Q. & NILSEN-HAMILTON, M. 1995. Identification of a new acute phase protein. *J Biol Chem*, 270, 22565-70.
- LODDICK, S. A., TURNBULL, A. V. & ROTHWELL, N. J. 1998. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18, 176-9.
- LOOMANS, H. J., HAHN, B. L., LI, Q. Q., PHADNIS, S. H. & SOHNLE, P. G. 1998. Histidine-based zinc-binding sequences and the antimicrobial activity of calprotectin. *J Infect Dis*, 177, 812-4.
- MAN, S., UBOGU, E. E. & RANSOHOFF, R. M. 2007. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain Pathol*, 17, 243-50.
- MASTROIACOVO, F., BUSCETI, C. L., BIAGIONI, F., MOYANOVA, S. G., MEISLER, M. H., BATTAGLIA, G., CARICASOLE, A., BRUNO, V. & NICOLETTI, F. 2009. Induction of the Wnt antagonist, Dickkopf-1, contributes to the development of neuronal death in models of brain focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29, 264-76.
- MATSUO, Y., KIHARA, T., IKEDA, M., NINOMIYA, M., ONODERA, H. & KOGURE, K. 1995. Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15, 941-7.
- MATSUSE, H., YANAGIHARA, K., MUKAE, H., TANAKA, K., NAKAZATO, M. & KOHNO, S. 2007. Association of plasma neutrophil elastase levels with other inflammatory mediators and clinical features in adult patients with moderate and severe pneumonia. *Respir Med*, 101, 1521-8.

- MEISEL, C., SCHWAB, J. M., PRASS, K., MEISEL, A. & DIRNAGL, U. 2005. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci*, 6, 775-86.
- MERGENTHALER, P., DIRNAGL, U. & MEISEL, A. 2004. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis*, 19, 151-67.
- MHAIRI MACRAE, I. 1992. New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol*, 34, 302-8.
- MIRANDA, C. J., BRAUN, L., JIANG, Y., HESTER, M. E., ZHANG, L., RIOLO, M., WANG, H., RAO, M., ALTURA, R. A. & KASPAR, B. K. 2012. Aging brain microenvironment decreases hippocampal neurogenesis through Wnt-mediated survivin signaling. *Aging Cell*, 11, 542-52.
- MONTANER, J., ALVAREZ-SABIN, J., MOLINA, C. A., ANGLES, A., ABILLEIRA, S., ARENILLAS, J. & MONASTERIO, J. 2001. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke*, 32, 2762-7.
- MOON, R. T., KOHN, A. D., DE FERRARI, G. V. & KAYKAS, A. 2004. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*, 5, 691-701.
- NACKEN, W., ROTH, J., SORG, C. & KERKHOFF, C. 2003. S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microsc Res Tech*, 60, 569-80.
- NAKAJIMA, K. & KOHSAKA, S. 2001. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biochem*, 130, 169-75.
- NEHLS, D. G., PARK, C. K., MACCORMACK, A. G. & MCCULLOCH, J. 1990. The effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade with MK-801 upon the relationship between cerebral blood flow and glucose utilisation. *Brain Res*, 511, 271-9.
- NEUMANN, C. A., CAO, J. & MANEVICH, Y. 2009. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle*, 8, 4072-8.
- NEUMANN, J., SAUERZWEIG, S., RONICKE, R., GUNZER, F., DINKEL, K., ULLRICH, O., GUNZER, M. & REYMANN, K. G. 2008. Microglia cells protect neurons by direct

- engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *J Neurosci*, 28, 5965-75.
- NICHOLLS, D. & ATTWELL, D. 1990. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci*, 11, 462-8.
- NIEHRS, C. 2006. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, 25, 7469-81.
- NIIDA, A., HIROKO, T., KASAI, M., FURUKAWA, Y., NAKAMURA, Y., SUZUKI, Y., SUGANO, S. & AKIYAMA, T. 2004. DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene*, 23, 8520-6.
- NILUPUL PERERA, M., MA, H. K., ARAKAWA, S., HOWELLS, D. W., MARKUS, R., ROWE, C. C. & DONNAN, G. A. 2006. Inflammation following stroke. *J Clin Neurosci*, 13, 1-8.
- NOLL, S., SCHAUB-KUHNEN, S., HÖFLER, H. & MÜLLER, K. M. 2000. *Praxis der Immunhistochemie*, Urban & Fischer.
- OECD. 1999. *OECD-Grundsätze der Guten Laborpraxis* [Online]. Paris: OECD. Available: [http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocument/?cote=env/mc/chem\(98\)17&doclanguage=de](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocument/?cote=env/mc/chem(98)17&doclanguage=de) [Accessed May 27 2012].
- OEGSF. 2010. *Zahlen und Fakten* [Online]. Available: <http://www.oegsf.at/aerzte/index.php?page=zahlen-und-fakten-2> [Accessed May 19 2012].
- OFFNER, H., SUBRAMANIAN, S., PARKER, S. M., AFENTOULIS, M. E., VANDENBARK, A. A. & HURN, P. D. 2006. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26, 654-65.
- ORION, D., SCHWAMMENTHAL, Y., RESHEF, T., SCHWARTZ, R., TSABARI, R., MERZELIAK, O., CHAPMAN, J., MEKORI, Y. A. & TANNE, D. 2008. Interleukin-6 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in acute brain ischaemia. *Eur J Neurol*, 15, 323-8.
- PANTONI, L., SARTI, C. & INZITARI, D. 1998. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 503-13.

- PARK, K. J., KIM, Y. J., KIM, J., KIM, S. M., LEE, S. Y., BAE, J. W., HWANG, K. K., KIM, D. W. & CHO, M. C. 2012. Protective effects of peroxiredoxin on hydrogen peroxide induced oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes. *Korean Circ J*, 42, 23-32.
- PEREZ CASTRILLON, J. L., SAN MIGUEL, A., VEGA, G., ABAD, L., ANDRES DOMINGO, M., GONZALEZ SAGREDO, M., DE LUIS, D. & DUENAS-LAITA, A. 2010. Levels of DKK1 in patients with acute myocardial infarction and response to atorvastatin. *Int J Cardiol*, 145, 164-5.
- PLANAS, A. M. & TRAYSTMAN, R. J. 2011. Advances in translational medicine 2010. *Stroke*, 42, 283-4.
- POECK, K. & HACKE, W. 2006. *Neurologie 85 Tabellen ; neue Aprobationsordnung*, Heidelberg, Springer-Medizin-Verl.
- POPP, A., JAENISCH, N., WITTE, O. W. & FRAHM, C. 2009. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One*, 4, e4764.
- PROSPERI, M. T., FERBUS, D., KARZINSKI, I. & GOUBIN, G. 1993. A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. *J Biol Chem*, 268, 11050-6.
- RAIVICH, G., BOHATSCHKEK, M., KLOSS, C. U., WERNER, A., JONES, L. L. & KREUTZBERG, G. W. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev*, 30, 77-105.
- RALLIDIS, L. S., VIKELIS, M., PANAGIOTAKOS, D. B., RIZOS, I., ZOLINDAKI, M. G., KALIVA, K. & KREMASTINOS, D. T. 2006. Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischaemic stroke. *Atherosclerosis*, 189, 193-7.
- RAMMES, A., ROTH, J., GOEBELER, M., KLEMPT, M., HARTMANN, M. & SORG, C. 1997. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem*, 272, 9496-502.

- REICHE, D. 2003. *Roche Lexikon Medizin*, München, Urban & Fischer Verlag / Elsevier GmbH.
- RHEE, S. G., CHAE, H. Z. & KIM, K. 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med*, 38, 1543-52.
- RIDDELL, J. R., WANG, X. Y., MINDERMAN, H. & GOLLNICK, S. O. 2010. Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4. *J Immunol*, 184, 1022-30.
- ROBINSON, M. J., TESSIER, P., POULSOM, R. & HOGG, N. 2002. The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J Biol Chem*, 277, 3658-65.
- ROGER, V. L., GO, A. S., LLOYD-JONES, D. M., BENJAMIN, E. J., BERRY, J. D., BORDEN, W. B., BRAVATA, D. M., DAI, S., FORD, E. S., FOX, C. S., FULLERTON, H. J., GILLESPIE, C., HAILPERN, S. M., HEIT, J. A., HOWARD, V. J., KISSELA, B. M., KITTNER, S. J., LACKLAND, D. T., LICHTMAN, J. H., LISABETH, L. D., MAKUC, D. M., MARCUS, G. M., MARELLI, A., MATCHAR, D. B., MOY, C. S., MOZAFFARIAN, D., MUSSOLINO, M. E., NICHOL, G., PAYNTER, N. P., SOLIMAN, E. Z., SORLIE, P. D., SOTOODEHNIA, N., TURAN, T. N., VIRANI, S. S., WONG, N. D., WOO, D. & TURNER, M. B. 2012. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 125, e2-e220.
- ROSI, M. C., LUCCARINI, I., GROSSI, C., FIORENTINI, A., SPILLANTINI, M. G., PRISCO, A., SCALI, C., GIANFRIDDO, M., CARICASOLE, A., TERSTAPPEN, G. C. & CASAMENTI, F. 2010. Increased Dickkopf-1 expression in transgenic mouse models of neurodegenerative disease. *J Neurochem*, 112, 1539-51.
- ROTHWELL, N., ALLAN, S. & TOULMOND, S. 1997. The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. *J Clin Invest*, 100, 2648-52.
- SAVILL, J., FADOK, V., HENSON, P. & HASLETT, C. 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, 14, 131-6.
- SCALI, C., CARACI, F., GIANFRIDDO, M., DIODATO, E., RONCARATI, R., POLLIO, G., GAVIRAGHI, G., COPANI, A., NICOLETTI, F., TERSTAPPEN, G. C. & CARICASOLE,

- A. 2006. Inhibition of Wnt signaling, modulation of Tau phosphorylation and induction of neuronal cell death by DKK1. *Neurobiol Dis*, 24, 254-65.
- SCHAFER, B. W. & HEIZMANN, C. W. 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*, 21, 134-40.
- SCHIFFL, H. & LANG, S. M. 2012. Update on Biomarkers of Acute Kidney Injury: Moving Closer to Clinical Impact? *Mol Diagn Ther*.
- SCHILLING, M., BESSELMANN, M., LEONHARD, C., MUELLER, M., RINGELSTEIN, E. B. & KIEFER, R. 2003. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*, 183, 25-33.
- SCHREIBELT, G., VAN HORSSSEN, J., HASELOFF, R. F., REIJERKERK, A., VAN DER POL, S. M., NIEUWENHUIZEN, O., KRAUSE, E., BLASIG, I. E., DIJKSTRA, C. D., RONKEN, E. & DE VRIES, H. E. 2008. Protective effects of peroxiredoxin-1 at the injured blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med*, 45, 256-64.
- SCHWAB ET AL, H. 1999. *Neurologische Intensivmedizin*, Berlin u.a., Springer.
- SEIFERT-HELD, T., PEKAR, T., GATTRINGER, T., SIMMET, N. E., SCHARNAGL, H., STOJAKOVIC, T., FAZEKAS, F. & STORCH, M. K. 2011. Circulating Dickkopf-1 in acute ischemic stroke and clinically stable cerebrovascular disease. *Atherosclerosis*, 218, 233-7.
- SHICHITA, T., HASEGAWA, E., KIMURA, A., MORITA, R., SAKAGUCHI, R., TAKADA, I., SEKIYA, T., OOBOSHI, H., KITAZONO, T., YANAGAWA, T., ISHII, T., TAKAHASHI, H., MORI, S., NISHIBORI, M., KURODA, K., AKIRA, S., MIYAKE, K. & YOSHIMURA, A. 2012. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med*.
- SHIMAKURA, A., KAMANAKA, Y., IKEDA, Y., KONDO, K., SUZUKI, Y. & UMEMURA, K. 2000. Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion. *Brain Res*, 858, 55-60.
- SIDOW, A. 1992. Diversification of the Wnt gene family on the ancestral lineage of vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5098-102.

- SIEGENTHALER, W. & BLUHM, M. E. 2006. *Klinische Pathophysiologie*, Stuttgart, Thieme.
- SIES, H. & MEHLHORN, R. 1986. Mutagenicity of nitroxide-free radicals. *Arch Biochem Biophys*, 251, 393-6.
- SIESJO, B. K. & BENGTSSON, F. 1989. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 9, 127-40.
- SITZER, M., DVORAK, F. & FÖRCH, C. 2007. Biomarker des Schlaganfall - Klinische Relevanz in Diagnose und Prognose. *Nervenheilkunde*, 26, 16.
- SONDERGAARD, T. E., PEDERSEN, P. T., ANDERSEN, T. L., SOE, K., LUND, T., OSTERGAARD, B., GARNERO, P., DELAISSE, J. M. & PLESNER, T. 2009. A phase II clinical trial does not show that high dose simvastatin has beneficial effect on markers of bone turnover in multiple myeloma. *Hematol Oncol*, 27, 17-22.
- STEVENS, S. L., BAO, J., HOLLIS, J., LESSOV, N. S., CLARK, W. M. & STENZEL-POORE, M. P. 2002. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res*, 932, 110-9.
- STOWE, A. M., ADAIR-KIRK, T. L., GONZALES, E. R., PEREZ, R. S., SHAH, A. R., PARK, T. S. & GIDDAY, J. M. 2009. Neutrophil elastase and neurovascular injury following focal stroke and reperfusion. *Neurobiol Dis*, 35, 82-90.
- STRIZ, I. & TREBICHAVSKY, I. 2004. Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res*, 53, 245-53.
- STURROCK, A., FRANKLIN, K. F., WU, S. & HOIDAL, J. R. 1998. Characterization and localization of the genes for mouse proteinase-3 (Prtn3) and neutrophil elastase (Ela2). *Cytogenet Cell Genet*, 83, 104-8.
- SVEDIN, P., HAGBERG, H., SAVMAN, K., ZHU, C. & MALLARD, C. 2007. Matrix metalloproteinase-9 gene knock-out protects the immature brain after cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurosci*, 27, 1511-8.
- TAGAMI, T., KUSHIMOTO, S., TOSA, R., OMURA, M., YONEZAWA, K., AKIYAMA, G., HIRAMA, H. & YOKOTA, H. 2011. Plasma neutrophil elastase correlates with

- pulmonary vascular permeability: a prospective observational study in patients with pneumonia. *Respirology*, 16, 953-8.
- TAKAHASHI, H., NUKIWA, T., YOSHIMURA, K., QUICK, C. D., STATES, D. J., HOLMES, M. D., WHANG-PENG, J., KNUTSEN, T. & CRYSTAL, R. G. 1988. Structure of the human neutrophil elastase gene. *J Biol Chem*, 263, 14739-47.
- TARKOWSKI, E., ROSENGREN, L., BLOMSTRAND, C., WIKKELSO, C., JENSEN, C., EKHOLM, S. & TARKOWSKI, A. 1995. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke*, 26, 1393-8.
- THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-6.
- TOUHO, H. & KARASAWA, J. 1996. Evaluation of time-dependent thresholds of cerebral blood flow and transit time during the acute stage of cerebral embolism: a retrospective study. *Surg Neurol*, 46, 135-45; discussion 145-6.
- TOYOKUNI, S. 1999. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int*, 49, 91-102.
- TRUJILLO, M., FERRER-SUETA, G., THOMSON, L., FLOHE, L. & RADI, R. 2007. Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite. *Subcell Biochem*, 44, 83-113.
- TUTTOLOMONDO, A., DI SCIACCA, R., DI RAIMONDO, D., SERIO, A., D'AGUANNO, G., LA PLACA, S., PECORARO, R., ARNAO, V., MARINO, L., MONACO, S., NATALE, E., LICATA, G. & PINTO, A. 2009. Plasma levels of inflammatory and thrombotic/fibrinolytic markers in acute ischemic strokes: relationship with TOAST subtype, outcome and infarct site. *J Neuroimmunol*, 215, 84-9.
- UELAND, T., OTTERDAL, K., LEKVA, T., HALVORSEN, B., GABRIELSEN, A., SANDBERG, W. J., PAULSSON-BERNE, G., PEDERSEN, T. M., FOLKERSEN, L., GULLESTAD, L., OIE, E., HANSSON, G. K. & AUKRUST, P. 2009. Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 1228-34.

- UYTTENBOOGAART, M., STEWART, R. E., VROOMEN, P. C., DE KEYSER, J. & LUIJCKX, G. J. 2005. Optimizing cutoff scores for the Barthel index and the modified Rankin scale for defining outcome in acute stroke trials. *Stroke*, 36, 1984-7.
- VAN SWIETEN, J. C., KOUDSTAAL, P. J., VISSER, M. C., SCHOUTEN, H. J. & VAN GIJN, J. 1988. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke*, 19, 604-7.
- VEECK, J. & DAHL, E. 2012. Targeting the Wnt pathway in cancer: the emerging role of Dickkopf-3. *Biochim Biophys Acta*, 1825, 18-28.
- VIEMANN, D., STREY, A., JANNING, A., JURK, K., KLIMMEK, K., VOGL, T., HIRONO, K., ICHIDA, F., FOELL, D., KEHREL, B., GERKE, V., SORG, C. & ROTH, J. 2005. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood*, 105, 2955-62.
- VOGANATSI, A., PANYUTICH, A., MIYASAKI, K. T. & MURTHY, R. K. 2001. Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *J Leukoc Biol*, 70, 130-4.
- VOGEL, J., MOBIUS, C. & KUSCHINSKY, W. 1999. Early delineation of ischemic tissue in rat brain cryosections by high-contrast staining. *Stroke*, 30, 1134-41.
- VOORZANGER-ROUSSELOT, N., GOEHRIG, D., FACON, T., CLEZARDIN, P. & GARNERO, P. 2009. Platelet is a major contributor to circulating levels of Dickkopf-1: clinical implications in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*, 145, 264-6.
- VUKASOVIC, I., TESIJA-KUNA, A., TOPIC, E., SUPANC, V., DEMARIN, V. & PETROVIC, M. 2006. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in different acute stroke subtypes. *Clin Chem Lab Med*, 44, 428-34.
- WAJE-ANDREASSEN, U., KRAKENES, J., ULVESTAD, E., THOMASSEN, L., MYHR, K. M., AARSETH, J. & VEDELER, C. A. 2005. IL-6: an early marker for outcome in acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand*, 111, 360-5.
- WALTER, S., KOSTOPOULOS, P., HAASS, A., KELLER, I., LESMEISTER, M., SCHLECHTRIEMEN, T., ROTH, C., PAPANAGIOTOU, P., GRUNWALD, I., SCHUMACHER, H., HELWIG, S., VIERA, J., KORNER, H., ALEXANDROU, M.,

- YILMAZ, U., ZIEGLER, K., SCHMIDT, K., DABEW, R., KUBULUS, D., LIU, Y., VOLK, T., KRONFELD, K., RUCKES, C., BERTSCH, T., REITH, W. & FASSBENDER, K. 2012. Diagnosis and treatment of patients with stroke in a mobile stroke unit versus in hospital: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol*, 11, 397-404.
- WEISS, S. J. & REGIANI, S. 1984. Neutrophils degrade subendothelial matrices in the presence of alpha-1-proteinase inhibitor. Cooperative use of lysosomal proteinases and oxygen metabolites. *J Clin Invest*, 73, 1297-303.
- WHITELEY, W., CHONG, W. L., SENGUPTA, A. & SANDERCOCK, P. 2009. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*, 40, e380-9.
- WHITELEY, W., TSENG, M. C. & SANDERCOCK, P. 2008. Blood biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*, 39, 2902-9.
- WILDERMUTH, S., KNAUTH, M., BRANDT, T., WINTER, R., SARTOR, K. & HACKE, W. 1998. Role of CT angiography in patient selection for thrombolytic therapy in acute hemispheric stroke. *Stroke*, 29, 935-8.
- WOOD, Z. A., SCHRODER, E., ROBIN HARRIS, J. & POOLE, L. B. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, 28, 32-40.
- XU, S. Y., CARLSON, M., ENGSTROM, A., GARCIA, R., PETERSON, C. G. & VENGE, P. 1994. Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils. *Scand J Clin Lab Invest*, 54, 365-76.
- YAHALOM, G., SCHWARTZ, R., SCHWAMMENTHAL, Y., MERZELIAK, O., TOASHI, M., ORION, D., SELA, B. A. & TANNE, D. 2009. Chronic kidney disease and clinical outcome in patients with acute stroke. *Stroke*, 40, 1296-303.
- YANG, J., GOETZ, D., LI, J. Y., WANG, W., MORI, K., SETLIK, D., DU, T., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., STRONG, R. & BARASCH, J. 2002. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*, 10, 1045-56.
- YANG, Y., ESTRADA, E. Y., THOMPSON, J. F., LIU, W. & ROSENBERG, G. A. 2007. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 697-709.

- YILMAZ, G., ARUMUGAM, T. V., STOKES, K. Y. & GRANGER, D. N. 2006. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation*, 113, 2105-12.
- YILMAZ, G. & GRANGER, D. N. 2008. Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurol Res*, 30, 783-93.
- YONGLITTHIPAGON, P., PAIROJKUL, C., CHAMGRAMOL, Y., LOUKAS, A., MULVENNA, J., BETHONY, J., BHUDHISAWASDI, V. & SRIPA, B. 2012. Prognostic significance of peroxiredoxin 1 and ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 in cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*.
- YRJANHEIKKI, J., TIKKA, T., KEINANEN, R., GOLDSTEINS, G., CHAN, P. H. & KOISTINAHO, J. 1999. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13496-500.
- YUAN, J. & YANKNER, B. A. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407, 802-9.
- ZHANG, R. L., CHOPP, M., JIANG, N., TANG, W. X., PROSTAK, J., MANNING, A. M. & ANDERSON, D. C. 1995. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke*, 26, 1438-42; discussion 1443.
- ZIEGLER, G., PRINZ, V., ALBRECHT, M. W., HARHAUSEN, D., KHOJASTEH, U., NACKEN, W., ENDRES, M., DIRNAGL, U., NIETFELD, W. & TRENDELENBURG, G. 2009. Mrp-8 and -14 mediate CNS injury in focal cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta*, 1792, 1198-204.
- ZIEGLER, S., ROHRS, S., TICKENBROCK, L., LANGERAK, A., CHU, S. T., FELDMANN, I., JAKUBOWSKI, N. & MULLER, O. 2007. Lipocalin 24p3 is regulated by the Wnt pathway independent of regulation by iron. *Cancer Genet Cytogenet*, 174, 16-23.
- ZLOKOVIC, B. V. 2006. Remodeling after stroke. *Nat Med*, 12, 390-1.

ZWADLO, G., SCHLEGEL, R. & SORG, C. 1986. A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues. *J Immunol*, 137, 512-8.

13 Curriculum Vitae

THOMAS PEKAR, MA

Kalsdorfer Ring 17, 8401 Kalsdorf
E-Mail: thomas@pekar.co.at



„Die Weisheit eines Menschen misst man nicht nach seinen Erfahrungen, sondern nach seiner Fähigkeit, Erfahrungen zu machen.“

George Bernard Shaw

Persönliches

Geburtsdatum: 22.12.1983
Geburtsort: Leoben
Nationalität: Österreich
Konfession: röm. – Katholisch
Familienstand: Lebenspartnerschaft

Ausbildung

- 2010 - dato
Doktoratsstudium der medizinischen Wissenschaft
Medizinische Universität Graz
- 2009 - dato
Doktoratsstudium der Betriebswirtschaft
Karl-Franzens Universität Graz (dzt. karenziert)
- 2007 - 2009
Masterstudium „Gesundheitsmanagement“
Fachhochschule Kärnten
- 2003 - 2006
Ausbildung zum medizinisch technischen Analytiker
Akademie für den medizinisch technischen Laboratoriumsdienst Graz
- 1994 - 2002
Bischöfliches Gymnasium Graz

Abschlussarbeiten

2009

Masterthesis „Masterstudiengang zur Aneignung von Führungsqualifikationen für den Gesundheitssektor in Graz? - Eine Bedarfsanalyse.“

2006

Diplomarbeit „In vitro Aktivität der neuen Antibiotika Linezolid und Tigecycline versus Glykopeptidantibiotika bei MRSA“

Weiterbildung

2011 - 2012

Kurzlehrgang „Forschung“

2011

11.Kurs der European School of Neuroimmunology in Glasgow

2010

Universitätslehrgang „Einführung in Labortierkunde“ - FELASA B
Veterinärmedizinische Universität Wien

2009

Business English an der FH Kärnten

2009

Qualitätsmanagement an Hochschulen

2008

Praktikum bei Diather Krankenhausmanagement

2007

HOPE - Eine neue Technik in der Immunhistochemie

Auszeichnung

2011

Posterpreis beim 11. Austrian Neuroscience Wintermeeting in Kitzbühel

Funktionen

2010 - 2012

Mitglied im Currikularkomitee der Doktoratsschule TMCB

2010 - 2012

Supervisor bei der GEN-AU Summerschool

2010 - 2012

Mitglied im QM-Team

2009 - 2012

Hygiene Beauftragter

Anstellungen

2012 -

Fachhochschule Wiener Neustadt

2006 - 2012

Neuroimmunologisches Labor - Universitätsklinik für Neurologie Graz

2006

Advanced Medical Products - Leoben

2004 - 2006

Fa. Tann - Graz

1999 - 2002

Ferialjobs (LKH Leoben, Fischmarkt, Post AG)

Wehrdienst

2003

ABC - Abwehrkompanie Graz

14 Anhang

NIH-Stroke Scale

Download am 23.01.2010

www.aneurysmen.at/aneudb/help/de/NIHSS_deutsch.pdf

NIH-Stroke Scale – deutsche Version

Überprüfen Sie die Items der Schlaganfallskala in der vorgegebenen Reihenfolge. Notieren Sie das Ergebnis jeder Kategorie unmittelbar nach der Untersuchung der jeweiligen Subskala. Gehen Sie nicht zurück und ändern Sie kein Ergebnis. Folgen Sie den Anweisungen für die jeweiligen Untersuchungen. Die Ergebnisse sollen reflektieren, was der Patient macht, nicht das, was der Patient nach Meinung des Arztes machen kann. Notieren Sie die Antworten während der Untersuchung und arbeiten Sie zügig. Der Patient soll nicht angeleitet werden (beispielsweise keine wiederholte Aufforderung an den Patienten, eine besondere Leistung zu erbringen), es sei denn, es ist ausdrücklich vorgesehen. Für ein nicht untersuchtes Item muss eine detaillierte Erklärung auf den Untersuchungsbogen geschrieben werden. Bei Anwendung in klinischen Studien sollte der medizinische Studienmonitor alle nach-untersuchten Items durchsehen und mit den Untersucher besprechen.

Patient:

1.a Bewusstseinszustand

Der Untersucher muss eine Antwort wählen, auch wenn eine vollständige Untersuchung durch Hindernisse wie einen endotrachealen Tubus, Sprachbarrieren, orotracheales Trauma oder Verbände beeinträchtigt ist. Ein Score 3 ist nur dann erreicht, wenn sich der Patient auf Schmerzreize (außer reflexbedingte Lageänderungen) nicht bewegt.

- Wach, unmittelbar antwortend 0
 - Benommen, aber durch geringe Stimulation zum Befolgen von Aufforderungen, Antworten oder Reaktionen zu bewegen 1
 - Stuporös, bedarf wiederholter Stimulation um aufmerksam zu sein, oder ist somnolent und bedarf starker oder schmerzhafter Stimuli zum Erzielen von Bewegungen (keine Stereotypien) 2
 - Koma, antwortet nur mit motorischen oder vegetativen Reflexen oder reagiert gar nicht, ist schlaff und ohne Reflexe 3
-

1.b Fragen zum Bewusstseinszustand

Der Patient wird nach dem Monat und dem Alter gefragt. Die Antwort muss korrekt sein – es gibt keinen Punkt für fast zutreffende Antworten. Aphasische und stuporöse Patienten, die die Fragen nicht verstehen, erhalten den Score 2. Patienten, die aufgrund einer Intubation, eines orotrachealen Traumas, einer schweren Dysarthrie jeglicher Genese, Sprachbarriere oder irgendeines anderen Problems, das unabhängig von der Aphasie besteht, nicht sprechen können, erhalten den Score 1. Es ist wichtig, dass nur die zuerst gegebene Antwort bewertet wird und dass der Untersucher dem Patienten nicht mit verbalen oder non-verbalen Hinweisen „hilft“.

- Beantwortet beide Fragen richtig 0
 - Beantwortet eine Frage richtig 1
 - Beantwortet keine Frage richtig 2
-

1c. Aufforderungen zur Ermittlung des Bewusstseinszustandes

Der Patient wird gebeten, die Augen zu öffnen und zu schließen und danach die nicht-paretische Hand zu schließen und zu öffnen. Können die Hände nicht benutzt werden, kann ersatzweise eine andere einschrittige Aufforderung gegeben werden. Eindeutige Versuche, die aufgrund einer Schwäche nicht vollständig ausgeführt werden können, werden als erfolgreich bewertet. Falls der Patient auf die Aufforderungen nicht reagiert, soll die Bewegung vorgemacht (Pantomime) und das Ergebnis notiert werden (d. h. befolgt keine, ein oder zwei Anweisungen). Patienten mit Trauma, Amputation oder anderen körperlichen Beeinträchtigungen sollen passende einschrittige Aufgaben erhalten. Nur der erste Versuch wird bewertet.

- Führt beide Aufgaben richtig aus 0
 - Führt eine Aufgabe richtig aus 1
 - Führt keine Aufgabe richtig aus 2
-

2. Blickbewegungen

Es werden nur die horizontalen Augenbewegungen untersucht. Willkürliche oder reflektorische (oculocephale) Augenbewegungen werden bewertet, aber es findet keine kalorische Prüfung statt. Wenn der Patient eine konjugierte Blickdeviation zeigt, die durch willkürliche oder reflektorische Aktivität überwunden werden kann, beträgt der Score 1. Patienten mit isolierter peripherer Augenmuskelparese (III. IV. oder VI Hirnnerv), erhalten den Score 1. Blickbewegungen können bei allen aphasischen Patienten untersucht werden. Patienten mit Augenverletzungen, -verband, bevorstehender Blindheit oder einer anderen Erkrankungen des Visus oder des Gesichtsfeldes, sollen anhand von reflektorischen Bewegungen und einer vom Untersucher zu treffenden Auswahl untersucht werden. Das Herstellen eines Blickkontakts und nachfolgende Bewegungen im Gesichtsfeld des Patienten können gelegentlich helfen eine partielle Blickparese abzuklären.

- Normal 0
 - Partielle Blickparese. Dieser Punktwert wird vergeben, wenn die Blickrichtung von einem oder beiden Augen abnormal ist, jedoch keine forcierte Blickdeviation oder komplette Blickparese besteht. 1
 - Forcierte Blickdeviation oder komplette Blickparese, die durch Ausführen des oculocephalen Reflexes nicht überwunden werden kann. 2
-

3. Gesichtsfeld

Die Gesichtsfelder (obere und untere Quadranten) werden in Gegenüberstellung getestet, wobei Fingerzählen oder visuelle Gesten verwendet werden sollten. Patienten sollten zur Durchführung ermuntert werden, wenn sie korrekt auf die sich bewegende Hand blicken, wird dies als normal bewertet. Bei unilateraler Blindheit oder Z. n. Enukleation wird das Gesichtsfeld anhand des verbliebenen Auges bewertet. Der Score 1 wird nur dann vergeben, wenn eine eindeutige Asymmetrie, Quadrantenanopsie eingeschlossen, vorliegt. Wenn ein Patient aus irgendeinem Grund blind ist, so wird dies als Score 3 bewertet. Anschließend wird eine Untersuchung beider Seiten simultan durchgeführt. Wenn eine unilaterale Auslöschung besteht, erhält der Patient den Score 1 und das Ergebnis wird bei der Beantwortung von Frage 11 benutzt.

- keine Gesichtsfeldeinschränkung 0
 - Partielle Hemianopsie 1
 - Komplette Hemianopsie 2
 - Bilaterale Hemianopsie (Blindheit inklusive kortikaler Blindheit) 3
-

4. Facialisparese

Fordern Sie den Patienten verbal oder durch Pantomime auf, die Zähne zu zeigen, die Augenbrauen hochzuziehen und die Augen zu schließen. Bei wenig reagierenden oder verständnisunfähigen Patienten wird die Symmetrie der Gesichtszüge auf schmerzhafte Stimuli bewertet. Falls Gesichtsverletzungen, -verbände, ein orotrachealer Tubus, Pflaster oder andere physikalische Hindernisse das Gesicht verdecken, sollen diese soweit möglich entfernt werden.

- Normale symmetrische Bewegungen 0
 - Geringe Parese (abgeflachte Nasolabialfalte, Asymmetrie bei Lächeln) 1
 - Partielle Parese (vollständige oder fast vollständige Parese des unteren Gesichtes) 2
 - Vollständige Parese von einer oder zwei Seiten (Fehlen von Bewegungen vom oberen und unteren Teil des Gesichts) 3
-

5. und 6. Motorik von Armen und Beinen

Die Extremität wird in die passende Lage gebracht: ausgestreckte Arme (Handflächen nach unten) in 90° Position (sitzender Patient) oder in 45° Position (liegender Patient) und gestreckte Beine in 30° Position (Beine stets am liegenden Patienten untersuchen). Ein Absinken liegt vor: wenn ein Arm vor Ablauf von 10 Sekunden oder ein Bein vor Ablauf von 5 Sekunden absinkt. Ein aphasischer Patient wird durch Nachdrücklichkeit in der Stimme und Pantomime unterstützt, jedoch sollen keine Schmerzstimuli angewendet werden. Die Extremitäten werden nacheinander getestet, wobei mit dem nicht-paretischen Arm begonnen wird. Nur bei Amputation oder Gelenkversteifung an Schulter oder Hüfte darf der Score „9“ vergeben werden und der Untersucher muss dies schriftlich begründen.

5. Arme

- | | links | rechts |
|---|----------------------------|----------------------------|
| • Kein Absinken, die Extremität wird über 10 Sekunden In der 90° (oder 45°) Position gehalten | <input type="checkbox"/> 0 | <input type="checkbox"/> 0 |
| • Absinken, Extremität wird zunächst bei 90° (oder 45°) gehalten, sinkt aber vor Ablauf von 10 Sekunden ab; Das Bett (oder eine andere Unterlage) wird nicht berührt | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 1 |
| • Anheben gegen Schwerkraft möglich; Extremität kann die 90° (oder 45°) Position nicht erreichen oder halten, sinkt auf das Bett ab, kann aber gegen Schwerkraft angehoben werden | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 2 |
| • Kein (aktives) Anheben gegen Schwerkraft, Extremität fällt | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 3 |
| • Keine Bewegung | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 4 |
| • Amputation, Gelenkversteifung | <input type="checkbox"/> 9 | <input type="checkbox"/> 9 |

→ bitte erklären: _____

6. Beine

	links	rechts
• Kein Absinken, Bein bleibt über 5 Sekunden in der 30° Position	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0
• Absinken, Bein sinkt am Ende der 5-Sekundenperiode, berührt das Bett jedoch nicht	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 1
• Aktive Bewegungen gegen Schwerkraft, das Bein sinkt binnen 5 Sekunden auf das Bett ab, kann aber gegen die Schwerkraft gehoben werden	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 2
• Kein Anheben gegen die Schwerkraft, Bein fällt sofort auf das Bett	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3
• Keine Bewegung	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 4
• Amputation, Gelenkversteifung	<input type="checkbox"/> 9	<input type="checkbox"/> 9

→ bitte erklären: _____

7. Extremitäten Ataxie

Mit diesem Item sollen Hinweise für eine unilaterale Kleinhirnläsion gefunden werden. Untersuchen Sie bei geöffneten Augen. Sollte ein Gesichtsfeldausfall vorliegen, stellen Sie sicher, dass die Untersuchung im intakten Bereich des Gesichtsfeldes durchgeführt wird. Der Finger-Nase-Finger und der Knie-Hacke-Versuch wird auf beiden Seiten durchgeführt; eine Ataxie wird nur dann festgestellt, wenn sie über eine muskuläre Schwäche hinaus vorhanden ist. Eine Ataxie wird bei Patienten mit Verständnisschwierigkeiten oder Plegie als fehlend gewertet. Nur im Falle einer Amputation oder Gelenkversteifung kann dieses Item als 9 gewertet werden und der Untersucher muss dies schriftlich begründen. Bei Vorliegen einer Blindheit lassen Sie den Patienten einen einfachen Finger-Nase-Versuch durchführen.

- fehlend 0
- in einer Extremität vorhanden 1
- in zwei Extremitäten vorhanden 2

Falls vorhanden, besteht die Ataxie in:

Rechtem Arm

- Nein 1
- Ja 2
- Amputation, Gelenkversteifung 9

→ bitte erklären: _____

Linker Arm

- Nein 1
- Ja 2
- Amputation, Gelenkversteifung 9

→ bitte erklären: _____

Rechtem Bein

- Nein 1
- Ja 2
- Amputation, Gelenkversteifung 9

→ bitte erklären: _____

Linkem Bein

- Nein 1
- Ja 2
- Amputation, Gelenkversteifung 9

→ bitte erklären: _____

8. Sensibilität

Wahrnehmungen von oder Grimassieren auf Nadelreize oder Abwehrreaktion auf Schmerzreize beim somnolenten oder aphasischen Patienten. Nur Sensibilitätsstörungen die auf einen Schlaganfall zurückgeführt werden können, werden als abnorm bewertet; der Untersucher sollte so viele Körperregionen untersuchen (Arme (nicht Hände) Beine, Stamm, Gesicht) wie zur akkuraten Feststellung halbseitiger Sensibilitätsstörungen erforderlich sind. Einen Punktwert von 2 („schwer oder vollständig“) sollte nur vergeben werden, wenn ein schwerer oder vollständiger Sensibilitätsverlust deutlich nachgewiesen werden kann. Stuporöse und aphasische Patienten werden deshalb wahrscheinlich mit einer 1 oder 0 bewertet werden. Ein Patient mit Hirnstamminsult und beidseitigem Sensibilitätsverlust wird mit einer 2 bewertet. Ein Patient, der nicht antwortet und tetraplegisch ist, wird mit 2 bewertet. Komatöse Patienten (Item 1a = 3) werden bei diesem Item als 2 eingestuft.

- Normal, kein Sensibilitätsverlust 0
 - Leichter bis mittelschwerer Sensibilitätsverlust, Patient empfindet Nadelstiche auf der betroffenen Seite als weniger scharf oder stumpf oder es besteht ein Verlust des Oberflächenschmerzes für Nadelstiche, doch nimmt der Patient die Berührung wahr. 1
 - Schwerer bis vollständiger Sensibilitätsverlust, Patient nimmt die Berührung von Gesicht, arm und Bein nicht wahr. 2
-

9. Sprache

Die meisten Informationen über das Sprachverständnis werden bereits in den vorhergehenden Untersuchungsabschnitten gewonnen. Der Patient wird gebeten zu beschreiben, was auf dem beigefügten Bild geschieht, die Gegenstände auf dem Erkennungsbogen zu benennen und die Satzliste vorzulesen. Das Verständnis wird sowohl anhand der hierbei gegebenen Antworten als auch durch alle Antworten und Aufforderungen in der bisherigen allgemein-neurologischen Untersuchung beurteilt. Falls ein Visusverlust die Ausführung der Aufgaben behindert, bitten Sie den Patienten, Gegenstände, die in seine Hand gelegt werden, zu identifizieren, Gesprochenes nachzusprechen und eigenständig Sätze zu formulieren. Der intubierte Patient wird gebeten, schriftlich zu antworten. Komatöse Patienten (Item 1a = 3) werden bei diesem Item als 3 eingestuft. Bei stuporösen oder eingeschränkt kooperativen Patienten muss der Untersucher ein Punktwert festlegen, jedoch sollte ein Wert von 3 nur vergeben werden, wenn der Patient stumm ist und keine Aufforderungen befolgt.

- Keine Aphasie; normal 0
 - Leichte bis mittelschwere Aphasie, deutliche Einschränkung der Wortflüssigkeit oder des Sprachverständnisses, keine relevante Einschränkung von Umfang oder Art des Ausdrucks. Die Einschränkung des Sprachvermögens und/oder des Sprachverständnisses macht die Unterhaltung über die vorgelegten Untersuchungsmaterialien jedoch schwierig bis unmöglich. Beispielsweise kann der Untersucher in einer Unterhaltung über die vorgelegten Materialien anhand der Antwort des Patienten ein Bild oder eine Wortkarte zuordnen. 1
 - Schwere Aphasie, die gesamte Kommunikation findet über fragmentierte Ausdrucksformen statt: Der Zuhörer muss das Gesagte in großem Umfang interpretieren, nachfragen oder erraten. Der Umfang an Informationen, der ausgetauscht werden kann, ist begrenzt; der Zuhörer trägt im wesentlichen die Kommunikation. Der Untersucher kann die vorgelegten Materialien anhand der Antworten des Patienten nicht zuordnen 2
 - Stumm, globale Aphasie, keine verwertbare Sprachproduktion oder kein Sprachverständnis 3
-

10. Dysarthrie

Auch wenn der Eindruck eines Normalbefundes besteht sollte der Patient aufgefordert werden aus der beigefügten Liste Wörter vorzulesen oder zu wiederholen, um eine adäquate Sprachprobe zu erhalten. Im Falle einer schweren Aphasie kann die Artikulation von Spontansprache bewertet werden. Nur im Falle einer Intubation oder anderer mechanischer Behinderungen der Sprachproduktion sollte dieses Item als 9 bewertet werden und der Untersucher muss dies schriftlich begründen. Dem Patient soll nicht mitgeteilt werden, warum er/sie getestet wird.

- Normal 0
- Leicht bis mittelschwer; der Patient spricht zumindest einige Wörter verwaschen und kann schlimmstenfalls nur mit Schwierigkeiten verstanden werden 1
- Schwer; die verwaschene Sprache des Patienten ist unverständlich und beruht nicht auf einer Aphasie oder übersteigt das auf eine Aphasie zurückzuführende Maß oder Patient ist stumm / anarthrisch 2
- Intubation oder andere mechanische Behinderungen 9

→ bitter erklären: _____

11. Auslöschung und Nichtbeachtung (früher: Neglect)

Ausreichende Informationen um einen Neglect erkennen zu können sollten bereits während der vorangehenden Untersuchungen erhalten worden sein. Sollte der Patient einen schweren Visusverlust haben, der eine gleichzeitige visuelle Reizung beider Seiten unmöglich macht und die Reizung der Haut normal sein, so ist der Punktwert normal. Sollte der Patient eine Aphasie haben, aber beide Seiten zu beachten scheinen, so ist der Punktwert normal. Das Vorliegen eines räumlich-visuellen Neglects oder einer Anosognosie sollte ebenfalls als Hinweis auf eine Abnormalität gewertet werden. Da eine Abnormalität nur bei Vorhandensein gewertet wird, kann dieser Punkt immer untersucht werden.

- Keine Abnormalität 0
 - Visuelle, taktile, auditive, räumliche oder personenbezogene Unaufmerksamkeit oder Auslöschung bei der Überprüfung von gleichzeitiger bilateraler Stimulation in einer der sensiblen Qualitäten 1
 - Schwere halbseitige Unaufmerksamkeit oder halbseitige Unaufmerksamkeit in mehr als einer Qualität. Kein Erkennen der eigenen Hand oder Orientierung nur zu einer Seite des Raums. 2
-

Gesamtpunktwert

Bitte addieren Sie alle Punktwerte.

Gesamtpunktwert ___ ___

(Bitte beachten:

Fragen 5a und 5b: Eine Bewertung mit 9 = „Amputation“ bitte als 0 zählen.

Frage10: Eine Bewertung mit 9 = „Intubation oder andere mechanische Behinderungen“ bitte als 0 zählen).

NIHSS – deutsche Satzliste

- WISSEN SIE SCHON
- AUF DIE ERDE
- ICH GING VON DER ARBEIT NACH HAUSE
- AM TISCH IM ESSZIMMER
- SIE HÖRTEN IHN GESTERN ABEND IM RADIO SPRECHEN

NIHSS – deutsche Wortliste

- STUHL
- KREIS
- DREIECK
- TROPFEN
- FÜNFZEHN
- SIEBENHUNDERT-
EINUNDZWANZIG

