

Schaden und Nutzen von Gasbläschen in der zerebralen Zirkulation

Nadine Schleicher

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie der Justus-
Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. S. Wenisch

und

der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Nedelmann

Schaden und Nutzen von Gasbläschen in der zerebralen Zirkulation

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

NADINE SCHLEICHER

Tierärztin aus Geislingen an der Steige (Baden-Württemberg)

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Vorsitzende und 1. Gutachterin: Prof. Dr. Sabine Wenisch

2. Gutachter: Prof. Dr. Max Nedelmann

Prüfer: PD Dr. Martin Schmidt

Tag der Disputation: 26. April 2013

Meiner Familie

Per aspera ad astra

(nach Seneca)

INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG	1
1. Hintergrund	1
2. Zielsetzung.....	3
II LITERATURÜBERSICHT	5
1. Gasbläschen in der zerebralen Zirkulation	5
1.1 „Schädliche“ Gasbläschen: Zerebrale Gasmikroembolisationen.....	5
1.1.1 <i>Definition und Vorkommen</i>	5
1.1.1.1 <i>Humanmedizin</i>	5
1.1.1.2 <i>Veterinärmedizin</i>	6
1.1.2 <i>Pathophysiologie</i>	6
1.1.3 <i>Zusammensetzung der Gasbläschen</i>	8
1.1.4 <i>Neurologische Symptomatik</i>	9
1.1.5 <i>Präventions- und Interventionsmöglichkeiten</i>	10
1.1.5.1 <i>Filtersysteme</i>	10
1.1.5.2 <i>Ultraschall</i>	11
1.1.6 <i>Therapiemöglichkeiten</i>	11
1.2 „Nützliche“ Gasbläschen: Echokontrastverstärker	13
1.2.1 <i>Kurze Geschichte der Echokontrastverstärkung</i>	13
1.2.2 <i>Eigenschaften und Wirkweise der Echokontrastverstärker</i>	14
1.2.2.1 <i>Eigenschaften</i>	14
1.2.2.2 <i>Wirkweise</i>	16
1.2.2.3 <i>Weitere physikalische Effekte</i>	17
1.2.3 <i>Einsatz in der Neurologie</i>	18
2. Der Schlaganfall	19
2.1 Der Schlaganfall des Menschen.....	19
2.2 Der Schlaganfall in der Veterinärmedizin	20
2.3 Pathophysiologie des akuten ischämischen Schlaganfalls	21
2.3.1 <i>Ischämischer Zelluntergang</i>	21
2.3.2 <i>Penumbra</i>	23

2.4	Therapiemöglichkeiten thrombotisch-embolischer Gefäßverschlüsse	24
2.4.1	<i>Pharmakologische Thrombolyse</i>	24
2.5	„No Reflow“-Phänomen.....	25
3.	Therapeutischer Ultraschall beim Schlaganfall (Sonothrombolyse).....	26
3.1	Grundlagen des Ultraschalls	26
3.2	Geschichte der Sonothrombolyse	27
3.3	Wirkprinzip der Sonothrombolyse	27
3.4	Mikrobläschenverstärkte Sonothrombolyse.....	28
3.5	Wahl des Ultraschallfrequenzbereiches	30
4.	Experimentelle Schlaganfallforschung.....	31
4.1	Tiere in der Schlaganfallforschung	31
4.1.1	<i>Rattenstamm- und Geschlechterwahl</i>	32
4.2	Schlaganfallmodelle bei der Ratte	33
III MATERIAL UND METHODEN		35
1.	Allgemein	35
1.1	Versuchstiere	35
1.2	Analgesie und Narkose	36
1.3	Intraoperative Überwachung	37
1.3.1	<i>Innere Körpertemperatur und Atmung</i>	37
1.3.2	<i>Blutdruck und Blutproben</i>	37
1.3.3	<i>Blutgasanalyse</i>	38
1.4	Laser-Doppler-Messungen des zerebralen Blutflusses.....	38
1.5	Operationstechniken	40
1.5.1	<i>Das Fadenmodell</i>	40
1.5.1.1	<i>Fadenherstellung</i>	40
1.5.1.2	<i>Induktion der Ischämie</i>	41
1.5.1.3	<i>Reperfusion</i>	45
1.5.2	<i>Das Thrombembolienmodell</i>	45
1.5.2.1	<i>Präparation der Thromben</i>	45
1.5.2.2	<i>Induktion der Ischämie</i>	46
1.5.3	<i>Das Gasbläschenmodell</i>	48
1.5.3.1	<i>Erzeugung der Gasbläschen</i>	48

1.5.3.2	<i>Einleitung der Gasbläschen in die zerebrale Zirkulation</i>	51
1.6	Ultraschallprotokoll.....	52
1.6.1	<i>Einstellungen des Gerätes</i>	52
1.6.2	<i>Vorbereitungen für die 60-minütige Beschallung</i>	53
1.7	Wirkstoffapplikation.....	55
1.7.1	<i>rt-PA</i>	55
1.7.2	<i>Echosignalverstärker</i>	55
1.8	Klinisch-neurologische Untersuchungen.....	57
1.9	Magnetresonanztomografie.....	59
1.9.1	<i>Positionierung der Tiere</i>	59
1.9.2	<i>Bildgebung</i>	60
1.9.2.1	<i>Positionierung des Volumenresonators</i>	60
1.9.2.2	<i>Feinjustierung der Positionierung</i>	60
1.9.2.3	<i>Diffusionsgewichtete Bildgebung</i>	60
1.9.2.4	<i>Quantitative T2-Bildgebung</i>	61
1.9.2.5	<i>Planimetrische Auswertung der Läsionsvolumina und der Mittellinienverlagerung</i>	62
1.10	Postmortale Präparations- und Entnahmetechniken.....	63
1.10.1	<i>Intrakardiale Perfusion</i>	64
1.10.2	<i>Probenvorbereitung für die Mikro-CT-Bildgebung</i>	64
1.10.3	<i>Probenentnahme</i>	65
1.11	Mikro-Computertomografie.....	67
2.	Studiendesign.....	69
2.1	Experiment I: Mikrobäschenverstärkte Sonothrombolyse im mikrovaskulären Ischämie-Reperfusionen-Fadenmodell.....	69
2.1.1	<i>Ziel</i>	69
2.1.2	<i>Ablauf des Experimentes</i>	69
2.1.3	<i>Studiengruppeneinteilung</i>	70
2.1.4	<i>Ablauf der Therapie</i>	71
2.1.5	<i>Einschlusskriterien</i>	71
2.1.6	<i>Abbruch- und Ausschlusskriterien</i>	71
2.1.7	<i>Datenanalyse und statistische Auswertung</i>	72

2.2	Experiment II: Mikrobläschenverstärkte Sonothrombolyse im makrovaskulären Thrombemboliemodell	72
2.2.1	<i>Ziel</i>	72
2.2.2	<i>Ablauf des Experimentes</i>	72
2.2.3	<i>Studiengruppeneinteilung</i>	73
2.2.4	<i>Ablauf der Therapie</i>	74
2.2.5	<i>Einschlusskriterien</i>	74
2.2.6	<i>Abbruch- und Ausschlusskriterien</i>	74
2.2.7	<i>Datenanalyse und statistische Auswertung</i>	74
2.3	Experiment III: Einfluss der Bläschengröße bei zerebralen Luftmikroembolisationen	75
2.3.1	<i>Ziel</i>	75
2.3.2	<i>Ablauf des Experimentes</i>	75
2.3.3	<i>Studiengruppeneinteilung</i>	76
2.3.4	<i>Abbruch- und Ausschlusskriterien</i>	76
2.3.5	<i>Datenanalyse und statistische Auswertung</i>	77
IV	ERGEBNISSE	79
1.	Experiment I: Mikrobläschenverstärkte Sonothrombolyse im mikrovaskulären Ischämie-Reperfusion-Fadenmodell	79
1.1	Gruppenbesetzung.....	79
1.2	Ausschlusstiere und Komplikationsrate.....	79
1.3	Auswertung der Laser-Doppler-Messungen.....	80
1.4	Mikro-CT-Auswertung	83
2.	Experiment II: Mikrobläschenverstärkte Sonothrombolyse im makrovaskulären Thrombemboliemodell	85
2.1	Gruppenbesetzung.....	85
2.2	Ausschlusstiere und Komplikationsrate.....	86
2.3	Auswertung der Laser-Doppler-Messungen.....	87
2.4	<i>Post mortem</i> -Befunde	89
3.	Experiment III: Einfluss der Bläschengröße bei zerebralen Luftmikroembolisationen.....	92
3.1	Gruppenbesetzung.....	92
3.2	Physiologische Parameter.....	93

3.3	Luftbläscheneinleitung.....	93
3.4	Mortalitätsrate	93
3.5	Klinisch-neurologische Untersuchungen	94
3.6	Auswertung der MRT-Bilder	96
3.6.1	<i>ADC und T2-Relaxationszeit.....</i>	96
3.6.2	<i>Mittellinienverlagerung.....</i>	97
3.6.3	<i>Läsionsvolumina in der T2-Bildgebung.....</i>	97
V	DISKUSSION.....	99
1.	Mikrobläschenverstärkte Sonothrombolyse	99
1.1	Schlussfolgerungen aus dem mikrovaskulären Fadenmodell	100
1.1.1	<i>Modellwahl.....</i>	100
1.1.2	<i>Wiederherstellung des zerebralen Gefäßvolumens nach ischämischem Schlaganfall</i>	102
1.1.2.1	<i>Wirksamkeit des Mikrobläschenpräparates BR1</i>	102
1.1.2.2	<i>Wirksamkeit des Mikrobläschenpräparates BR38</i>	104
1.1.2.3	<i>Ist die Wirksamkeit der Mikrobläschenpräparate auf bestimmte zerebrale Gefäßanteile beschränkt?</i>	105
1.1.2.4	<i>Wirksamkeit des Fibrinolytikums rt-PA</i>	106
1.1.2.5	<i>Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen</i>	107
1.1.3	<i>Sicherheitsevaluation.....</i>	108
1.1.4	<i>Resümee und Ausblick</i>	109
1.2	Schlussfolgerungen aus dem makrovaskulären Thrombemboliemodell	111
1.2.1	<i>Modellwahl.....</i>	111
1.2.2	<i>Auflösung makrovaskulärer Gefäßverschlüsse.....</i>	112
1.2.2.1	<i>Wirksamkeit des Mikrobläschenpräparates BR38</i>	112
1.2.2.2	<i>Wirksamkeit des Fibrinolytikums rt-PA</i>	114
1.2.2.3	<i>Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen</i>	114
1.2.3	<i>Sicherheitsevaluation.....</i>	115
1.2.4	<i>Resümee und Ausblick</i>	115
1.3	Einsatzmöglichkeiten in der Veterinärmedizin.....	116
1.3.1	<i>Schlaganfall beim Tier? – Schlaganfall beim Tier!.....</i>	117
1.3.2	<i>Mikrobläschenverstärkte Sonothrombolyse bei Tieren mit akuten peripheren arteriellen und venösen Embolien und Thrombosen?.....</i>	120

2. Der Einfluss der Bläschengröße auf zerebrale Luftmikroembolisationen	122
2.1 Verlässlichkeit des gewählten Modells und weitere Einsatzmöglichkeiten	122
2.2 Kommt es tatsächlich auf die Größe an?	123
2.3 Neuevaluierung der bestehenden Präventionsmaßnahmen	126
3. Schaden und Nutzen von Gasbläschen in der zerebralen Zirkulation	128
VI ZUSAMMENFASSUNG	129
VII SUMMARY	131
VIII LITERATURVERZEICHNIS	133
IX ANHANG	159
1. Abkürzungsverzeichnis.....	159
2. Abbildungsverzeichnis	162
3. Tabellenverzeichnis	165
4. Materialien	167
5. Publikationen	175
6. Danksagung	182
7. Erklärung	184

I Einleitung

1. Hintergrund

Es ist allgemein bekannt, dass Gasbläschen, die – auf welchem Wege auch immer – in das Gefäßsystem eines Lebewesens eindringen, erhebliches schädliches Potential mit sich bringen. Das klinische Spektrum reicht von schwersten neurologischen Ausfällen und Todesfällen beim Menschen (Bove et al., 1974; Butler und Hills, 1985; Muth und Shank, 2000; van Hulst et al., 2003) und Tier (Klement et al., 1987; Liska und Poteet, 2003; Bradbury et al., 2005; Ahrar et al., 2007; Gunew et al., 2008; Pacifico et al., 2010) bis hin zu subtilen neuropsychologischen und neurokognitiven Defiziten bei humanen Patienten (Pugsley et al., 1994; Borger et al., 2001; Fearn et al., 2001; Gerriets et al., 2010b).

In der Humanmedizin werden deshalb zur Verhinderung derartiger Gasembolien bei Operationen mit der Herz-Lungen-Maschine die unterschiedlichsten Filtersysteme verwendet, die teilweise kontrovers diskutiert werden (Schönburg et al., 2001, 2003 und 2006; Gerriets et al., 2010b; Qiu et al., 2010). Weiterhin befinden sich zwei Systeme in Erprobung, zerebrale Gasembolien mittels Ultraschall zu verhindern (Sauren et al., 2007 und 2009; Nedelmann, *Schleicher* et al., Publikation eingereicht und akzeptiert).

Neben der erwähnten schädlichen Folgen können Bläschen einer bestimmten Zusammensetzung und Größe im Gefäßsystem jedoch auch nützlich sein. So werden einerseits spezielle Mikrobläschenpräparate in der sonografischen Diagnostik zur Ultraschallkontrastverstärkung genutzt (Gramiak und Shah, 1968; Della Martina et al., 2005; Droste, 2008; Greis, 2011), andererseits haben diese Mikrobläschenpräparate auch therapeutischen Nutzen in der Sonothrombolyse von Schlaganfallpatienten (Molina et al., 2006; Nedelmann, 2010; Meairs et al., 2012).

Der Schlaganfall steht in Deutschland nach Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen an dritter Stelle der Todesursachenstatistik. Ungefähr 196.000 Schlaganfälle ereignen sich deutschlandweit jährlich zum ersten, weitere 66.000 zum wiederholten

Mal. Von diesen insgesamt etwa 262.000 Schlaganfällen enden rund 63.000 tödlich (Stand 2008). Nur wenige der überlebenden Patienten haben nach ihrem Hirninfarkt keine bleibende Behinderung, viele kämpfen mit schwersten Alltagseinschränkungen sowie mit mittelschweren bis schweren Funktionsstörungen (Heuschmann et al., 2010). Je nach betroffener Gehirnregion reichen die Symptome von kontralateralen Hemiparesen und -plegien sowie Bewegungs- und Sensibilitätsstörungen über Verhaltensänderungen und Gedächtnisstörungen bis hin zu Seh- und Sprechstörungen sowie Inkontinenz (Casals et al., 2011).

Seit der Einführung sogenannter Stroke Units an deutschen Kliniken hat sich die akutstationäre Behandlung von Schlaganfallpatienten zwar deutlich verbessert, dennoch kommen lediglich 7 bis 10% aller Patienten für die intravenöse Thrombolysebehandlung mit dem Fibrinolytikum rt-PA (rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator, auch: Alteplase; engl. recombinant tissue-type plasminogen activator) in Frage (Heuschmann et al., 2010). Von den so therapierten Patienten übersteht jedoch auch nur jeder siebte den Schlaganfall ohne bleibende, alltagsrelevante Behinderung (Hacke et al., 2004).

Daher ist eine weitere mögliche Therapieoption die Sonothrombolyse, das heißt die Kombination der intravenösen Thrombolyse mit rt-PA mit der gleichzeitigen (meist transkraniellen) Ultraschallbehandlung (Nedermann et al., 2008a; Nedermann, 2010). Sonothrombolysegruppen zeigten in Studien gegenüber rt-PA-Lysegruppen deutlich verbesserte Gefäßrekanalisierungsraten und -zeiten (Alexandrov et al., 2000 und 2004; Eggers et al., 2003 und 2008).

Da der gesteigerte Therapieerfolg der Sonothrombolyse auf der Entstehung kleiner, gasgefüllter Hohlräume im ultraschallbehandelten Gefäßsystem beruht, kann die sonothrombolytische Wirkung nochmals erhöht werden, indem man die bereits erwähnten mikrobäschenhaltigen Ultraschallkontrastverstärker einsetzt (Nedermann, 2010; Meairs et al., 2012). Einige Studien konnten die so verbesserte Wirksamkeit der Sonothrombolyse ohne nennenswerte Nebenwirkungen nachweisen (Molina et al., 2006; Perren et al., 2008). In anderen Studien traten jedoch sowohl asymptomatische (Larrue et al., 2007; Dinia et al., 2009) als auch symptomatische Blutungen (Molina et al., 2009) bei den Patienten auf.

Letzteres zeigt überdeutlich, wie wichtig die sorgfältige präklinische Entwicklung und Evaluierung derartiger neuer Therapieverfahren ist.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, mittels dreier Experimente die Schädlichkeit und Nützlichkeit von Gasbläschen in der zerebralen Zirkulation zu untersuchen.

Im ersten Experiment soll die sonothrombolytische Wirksamkeit des neuen, speziell für die sonothrombolytische Therapie entwickelten Mikrobläschenpräparates BR38 und des bereits bekannten, diagnostischen Mikrobläschenpräparates SonoVue® im mikrovaskulären Ischämie-Reperfusion-Fadenmodell untersucht werden. Das bereits früher in der sonothrombolytischen Therapie als wirksam getestete Präparat SonoVue® dient hierbei zum einen als Erfolgskontrolle, zum anderen soll mit dieser Studie sein eigenes Wirkprinzip genauer erforscht werden. Weiterhin soll auch die Sicherheit beider Präparate bezüglich möglicher Blutungen evaluiert werden.

Im zweiten der drei Experimente soll das neue Präparat BR38 in der sonothrombolytischen Therapie des makrovaskulären Thrombembolielmodells untersucht werden und auch hier soll eine Sicherheitsevaluation durchgeführt werden.

Außerdem werden mögliche Einsatzgebiete der mikrobläschenverstärkten Sonothrombolyse in der Veterinärmedizin überdacht und diskutiert.

Mit der dritten und letzten Studie der vorliegenden Arbeit sollen die Auswirkungen unterschiedlich großer Bläschen bei zerebralen Luftmikroembolisationen untersucht werden. So können die derzeit in der Humanmedizin eingesetzten Filtersysteme zur Prävention zerebraler Gasembolien neu bewertet und vielleicht Möglichkeiten geschaffen werden, neue Systeme und Präventionsmöglichkeiten zu entwickeln.

II Literaturübersicht

1. Gasbläschen in der zerebralen Zirkulation

1.1 „Schädliche“ Gasbläschen: Zerebrale Gasmikroembolisationen

1.1.1 *Definition und Vorkommen*

1.1.1.1 *Humanmedizin*

Gelangt Gas in die zerebrale Zirkulation, so kann es dort je nach Menge und Verteilung zu schwersten neurologischen Ausfällen bis hin zum Tod führen. Diese zerebralen Gasmikroembolisationen (engl. cerebral gaseous microembolization, GME) entstehen meist iatrogen und kommen in der Humanmedizin häufig als schwerwiegende Komplikation bei interventionellen Eingriffen der Radiologie sowie der Thorax- und Herzchirurgie und dort vor allem beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine vor (Gerriets et al., 2010b; Gale et al., 2004; Gupta et al., 2007; Muth und Shank, 2000; Hogue et al., 1999; Taylor, 1998; Roach et al., 1996; Hodics und Linfante, 2003; Fukaya und Hopf, 2007; Armon et al., 1991; Stump et al., 1996). Kleine Mengen an Gasmikroemboli lassen sich ebenfalls bei Patienten mit künstlichen Herzklappen finden (Kaps et al., 1997) und bei neurochirurgischen Patienten, die in sitzender Position operiert werden (Giebler et al., 1996; Porter et al., 1999). GME konnten ebenfalls bei Eingriffen zum Hüftgelenksersatz (Ngai et al., 1974) sowie bei Kaiserschnitten nachgewiesen werden (Weissman et al., 1996).

Auch bei Tauchern kann es bei schnellen Änderungen des Umgebungsdruckes, vor allem bei zu schnellem Auftauchen, zum pulmonalen Barotrauma und zur Entstehung von GME kommen (Gerriets et al., 2003c; Levett und Millar, 2008; Leitch und Green, 1986; Knauth et al., 1997; Erdem et al., 2009).

1.1.1.2 *Veterinärmedizin*

In der Veterinärmedizin finden sich in der Literatur nur vereinzelt Fallberichte meist venöser Gasembolisationen mit vornehmlich letalem Ausgang. Dabei gelangte das Gas meist über einen intravenösen Katheter in die Zirkulation (Walsh et al., 2005; Bradbury et al., 2005; Pacifico et al., 2010), ein Pferd zeigte danach auch neurologische Symptomatik (Holbrook et al., 2007). Weitere venöse Luftembolien mit fatalem Herzstillstand traten bei Katzen während Zahnextraktion (Gunew et al., 2008), Pneumozystografie (Thayer et al., 1980) und während der Endoskopie eines retropharyngealen Divertikulums (Ober et al., 2006) auf. Ein erhöhtes Risiko für Luftembolisationen besteht ebenfalls bei Laparoskopien der großen Körperhöhlen (Gilroy und Anson, 1987; Staffieri et al., 2007; Ahrar et al., 2007) und auch bei osteosynthetischen Eingriffen kann es über eröffnete Knochen zur Entstehung von Luftembolien kommen (Liska und Poteet, 2003).

Den einzigen Bericht zu einem Todesfall beim Hund mit nachgewiesenem zerebralem Luftembolismus findet sich bei einer Studie aus dem Jahr 1987 zum Mitralklappenersatz mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine bei Hypothermie an neun Hunden (Klement et al.).

1.1.2 *Pathophysiologie*

Entscheidend über die pathophysiologischen Vorgänge und damit die Auswirkungen der GME sind die Größe der eingedrungenen Bläschen sowie das Gesamtvolumen und die Zusammensetzung des Gases. Ohne Zweifel hat das Eindringen großer Gasvolumina tödliche Folgen, wie klinische Beobachtungen und experimentelle Studien nachweisen konnten (Bove et al., 1974; Butler und Hills, 1985; Muth und Shank, 2000). Die Konsequenzen, die GME kleinerer Gasvolumina nach sich ziehen, sind dagegen derzeit nur wenig erforscht. Gefürchtete und oft gesehene Komplikationen nach herz- und thoraxchirurgischen Eingriffen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine sind neuropsychologische und neurokognitive Defizite, die eine beträchtliche Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Patienten nach sich ziehen und auch negative Auswirkungen auf die Rehabilitation der Patienten haben (Gerriets et al., 2010b; Pugsley et al., 1994; Borger et al., 2001; Fearn et al., 2001).

Gasbläschen besitzen per se eine runde, sphärische Form, zeigen aber mit abnehmendem Gefäßdurchmesser ein zunehmend zylindrisches Aussehen mit abgerundeter Kappe (Branger und Eckmann, 1999). Die Bläschenoberfläche gelangt schließlich in Kontakt zum Endothel des Blutgefäßes und das Bläschen selbst wird durch das Gefäß komprimiert. In derart engem Kontakt verursacht es im weiteren Verlauf über mechanische Scherkräfte die funktionelle Abrasion der Endothelzellen und führt zur Lückenbildung im Endothelzellverband, was wiederum die interstitielle Ödembildung fördert (Townsend et al., 1988; Moosavi et al., 1981; Barak und Katz, 2005).

Ferner kommt es durch den Kontakt zwischen Gasbläschen und Gefäßendothel zur Einwanderung von Entzündungszellen und zur Entzündung (Inflammation) (Barak und Katz, 2005; Mitchell und Gorman, 2002). Die Entzündungszellen (vor allem die neutrophilen Granulozyten) produzieren freie Radikale und setzen proteolytische Enzyme frei, welche die Gefäßpermeabilität erhöhen (Ohkuda et al., 1978 und 1981). Auch das durch den Kontakt zwischen Gasbläschen und Endothel aktivierte Komplementsystem fördert die vaskuläre Permeabilität weiter (Lee und Hairston, 1971; Ward et al., 1986 und 1990; Huang und Lin, 1997).

Des Weiteren kommt es in der Umgebung von Gasbläschen über die Aktivierung der Gerinnungskaskade zur Thrombenbildung (Malik et al. 1982; Barak und Katz, 2005). Zum einen lagern sich Thrombozyten an der Bläschenoberfläche an (Thorsen et al., 1987; Warren et al., 1973; Ritz-Timme et al., 1998), zum anderen kommt es durch den durch die Bläschen verursachten Schaden am Gefäßendothel zur Expression von Thromboplastin mit anschließender Thrombozytenaktivierung und Gerinnselstehung (Warren et al., 1973; Thorsen et al., 1993).

Diese pathophysiologischen Abläufe, die allein durch den Kontakt zwischen Gasbläschen und Endothel entstehen, erklären auch, weshalb in experimentellen Studien mit Gasbläschen, deren Durchmesser kleiner als die kleinste Kapillare war (Mikrobläschen) und die damit eigentlich zu keinem Gefäßverschluss führen durften, neurologische Defizite festgestellt werden konnten (Feinstein et al., 1984; Helps et al., 1990; Hills und James, 1991). Diese Mikrobläschen, die den zerebralen kapillären Blutfluss kaum stören, können unter Umständen zu einem sofortigen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (BHS) führen (Johansson, 1980).

Größere Gasbläschen hingegen bleiben mit abnehmendem Gefäßdurchmesser irgendwann stecken und verschließen das Gefäß. Kleinere Gasemboli können wiederum nach dem ersten Steckenbleiben noch umverteilt werden und führen so zu transienten Ischämien in verschiedenen Versorgungsgebieten mit damit einhergehenden unterschiedlichsten neurologischen Symptomen (Mitchell und Gorman, 2002; Kau et al., 2008). Des Weiteren können sich in einem Blutgefäß aufeinanderfolgende Bläschen entweder zu einem größeren Bläschen zusammenlagern oder sich in diesem Gefäß perlschnurartig aufreihen. Gasbläschen können sich aber auch an Gefäßabzweigungen in zwei oder mehrere kleinere Bläschen teilen (Weenink et al., 2012; Barak und Katz, 2005).

Bleibt ein Gasbläschen in einem zerebralen Blutgefäß stecken und führt zu dessen Verschluss, erhöht sich zunächst der intrakranielle Druck (engl. intracranial pressure, ICP) (de la Torre et al., 1962). Der Blutfluss im Gehirn wird inhomogen umverteilt und hat Hyperämien und Ischämien in den entsprechenden Versorgungsgebieten zur Folge (Hossmann und Fritz, 1978; Fritz und Hossmann, 1979; Hossmann, 1998; Williams et al., 2001; Casals et al., 2011). Nach einer GME ist meist auch eine kurzzeitige generalisierte Hypertension nachweisbar, welche durchaus sinnvoll und erwünscht ist. Diese Erhöhung des Blutdruckes fördert nämlich die Umverteilung der Gasbläschen aus den Arteriolen und Kapillaren in das venöse System und trägt so zur Verminderung der Schäden durch die GME bei (Durant et al., 1949; Evans et al., 1981).

1.1.3 Zusammensetzung der Gasbläschen

Einen wichtigen Einfluss auf die Auswirkungen der Gasbläschen auf die zerebrale Zirkulation hat neben dem Durchmesser und dem Gesamtvolumen vor allem auch die Zusammensetzung der Bläschen, da diese wiederum ebenfalls die Aufenthaltsdauer und die Resorption der Bläschen in der Zirkulation beeinflusst. Die Grundlagen für die Löslichkeit eines Gasbläschens in Flüssigkeit wurden bereits 1950 von Epstein und Plesset formuliert, wobei von den der Gleichung zugrundeliegenden Parametern lediglich die nicht-konstanten wie die Temperatur, der Umgebungsdruck, der Durchmesser sowie je nach Situation die

Zusammensetzung des Gasbläschens klinisch und experimentell beeinflusst werden können.

Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeits- und Diffusionskoeffizienten der Gase zirkulieren die Bläschen unterschiedlich lange (Langø et al., 1996). Kohlendioxid ist mit einem Löslichkeitskoeffizienten von 4,0 beispielsweise sehr viel besser löslich als Sauerstoff (0,027), Stickstoff (0,147) und Stickoxid (0,47) (Ng und Rosen, 1968) und damit auch vergleichbar besser löslich als das Luftgemisch mit seinem sehr hohen Anteil an schlecht löslichem Stickstoff.

Neben Mikroemboli aus atmosphärischer Luft und Sauerstoff (Barak und Katz, 2005) kommen in der Medizin auch GME aus Kohlendioxid (Lin et al., 2003; McGrath et al., 1989; Staffieri et al., 2007), Stickstoffmonoxid (Sibai et al., 1996), Stickstoff (Schlinkert und Chapman, 1990; Gilroy und Anson, 1987) und Helium (Mitchell et al., 2000) regelmäßig vor.

1.1.4 Neurologische Symptomatik

Die neurologischen Erscheinungen der GME sind mannigfaltig und umfassen beim Menschen Beeinträchtigungen der Sehfähigkeit, Brustschmerzen, Sensibilitätsstörungen und Lähmungen, Schwindelanfälle, Übelkeit und Kopfschmerzen. Ungefähr 50% der Patienten sind zeitweise ohnmächtig, bei vielen kommen epileptische Anfälle vor (Gillen, 1968; Peirce, 1980a; Blanc et al., 2002; van Hulst et al., 2003). Eine Vielzahl an Studien berichtet auch von den bereits erwähnten neurokognitiven und neuropsychologischen Störungen der Patienten. Diese Störungen umfassen Verschlechterungen der (Langzeit-)Gedächtnisleistung und verbalen Fähigkeiten (wie zum Beispiel auch der Lesefähigkeit), reduzierte Aufmerksamkeit, Desorientierung und Verwirrtheit, teilweise reversible Persönlichkeitsveränderungen, Depressionen und andere (Gerriets et al. 2010a; Gerriets et al., 2010b; Fearn et al., 2001; Pugsley et al., 1994; Clark et al., 1995; Hammon et al., 1997; Newman, 2007).

1.1.5 Präventions- und Interventionsmöglichkeiten

1.1.5.1 Filtersysteme

In der Humanmedizin ist es daher üblich, beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine zur Reduktion der GME die unterschiedlichsten Filtersysteme in die extra- und teilweise auch intrakorporale Zirkulation einzusetzen.

So werden zum Abfangen von Gas- und partikulären Emboli Netzfilter mit unterschiedlichen Maschenweiten in den arteriellen Schenkel der Herz-Lungen-Maschine platziert. Die am häufigsten verwendete Maschenweite ist 40 µm (Pugsley et al., 1994; Schönburg et al., 2001).

Direkt in die Aorta eingebracht wird hingegen der sogenannte Embol-X-Filter, der aus einem heparinisierten Polyesternetz mit einer Maschenweite von 120 µm besteht. Dort soll er hauptsächlich Festkörper-Emboli aus abgelösten atherosklerotischen Plaques und Gerinnseln abfangen (Gerriets et al., 2010b).

Bei den beiden genannten Filterarten ist jedoch auch die Zerstäubung, sprich die Dispersion größerer Gasbläschen in viele kleinere Bläschen denkbar. Damit würde sich die potentiell schädliche Oberfläche der Gasbläschen, die mit dem Gefäßendothel in Kontakt kommen kann, stark vergrößern.

Weiterhin ist derzeit im arteriellen Schenkel der Herz-Lungen-Maschine auch noch die „dynamic bubble trap“ (DBT) im Einsatz. Diese fängt zentral aus dem Blutstrom Gasbläschen heraus und leitet sie aus dem extrakorporalen Bypass heraus (Reduktion der nachgewiesenen Gasemboli um 85%) (Gerriets et al., 2010b; Schönburg et al., 2001, 2003 und 2006; Perthel et al., 2005).

Außerdem besteht die Möglichkeit, Filtersysteme (teilweise mit Entlüftung) direkt in den Oxygenator zu integrieren und damit die Gasmikroemboli zu reduzieren (Qiu et al., 2010).

1.1.5.2 *Ultraschall*

Derzeit wird in der Humanmedizin ein 2,2 MHz-Ultraschall-System zur Reduktion der GME bei kardiochirurgischen Eingriffen untersucht. Der EmBlocker™ wird auf den Aortenbogen aufgebracht und soll dort mittels ablenkenden Ultraschallwellen verhindern, dass korpuskuläre und gasförmige Bestandteile in die gehirnversorgenden Arterien eindringen. Erste Studien deuten auf eine bessere Effektivität bei Gasembolien hin (Sauren et al., 2007) und im Patientenkollektiv zeigte sich die Reduktion der mit Dopplerultraschall nachgewiesenen zerebralen Mikroemboli auf 53% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sauren et al., 2009).

Eigene *in vitro*-Experimente zeigten zudem die Möglichkeit auf, mittels niederfrequentem Ultraschall (60 kHz) die Anzahl und Größe von Gasbläschen im arteriellen Schenkel der extrakorporalen Zirkulation deutlich zu reduzieren, ohne dass nachteilige Effekte auf ausgewählte Blutparameter aufgetreten wären. Mit dem „Bubble Buster“ konnten bis zu 87,1% der Luftemboli eliminiert werden und die Größe konnte bei 99% der restlichen Gasbläschen auf unter 15 µm reduziert werden (Nedelmann, *Schleicher* et al., Publikation eingereicht und akzeptiert).

1.1.6 *Therapiemöglichkeiten*

Kommt es trotz durchgeführter Präventions- und Interventionsmaßnahmen zur Gasembolisation, so sind die notwendigen therapeutischen Maßnahmen abhängig von der Größe der Emboli und der daraus entstehenden Symptomatik. Ein klares Behandlungsschema speziell für GME gibt es derzeit jedoch nicht, die Therapie der einzelnen Symptome steht im Vordergrund.

Bei großen Embolien kommt es meist zum Kreislaufstillstand. Zusätzlich zur kardiopulmonalen Wiederbelebung (Muth und Shank, 2000; Petts und Presson, 1992; van Hulst et al., 2003) muss ein Abfall des Blutdrucks verhindert werden, da andernfalls vermehrt Gasbläschen in den Endstromgebieten stecken bleiben. Zusätzlich fällt mit einem niedrigen systemischen Blutdruck auch die zerebrale Durchblutung stark ab, womit dann unter Umständen die Versorgung der Neuronen nicht mehr gewährleistet werden kann (Helps et al., 1990; Muth und Shank, 2000).

Bei der Dekompressionskrankheit der Taucher (Moon et al., 1999; Benson et al., 2003) und bei arteriellen Gasembolien (Peirce, 1980b; Tibbles und Edelsberg, 1996) wird als Standard die sogenannte hyperbare Oxygenierung durchgeführt. Dabei halten sich die Patienten in Überdruckkammern mit meist 100% Sauerstoff auf. Die Erhöhung des Umgebungsdruckes führt entsprechend der Gleichung von Epstein und Plesset (1950) zum einen zu einer besseren Löslichkeit der Gasbläschen und damit zu einem reduzierten Bläschenvolumen. Zum anderen wird der Sauerstoffpartialdruck des Blutes erhöht, was wiederum die Oxygenierung ischämischer Gewebe fördert (van Hulst et al., 2003; Dexter und Hindman, 1997; Leitch und Hallenbeck, 1985). Mehrere Studien konnten eine deutliche Besserung der durch GME verursachten neurologischen Symptome nach hyperbarer Oxygenierung nachweisen (Murphy et al., 1985; Kol et al., 1993; Blanc et al., 2002).

Demgegenüber wird der Einsatz von Medikamenten zur Therapie der GME in der Literatur kontrovers diskutiert (Moon et al., 1999; van Hulst et al., 2003; Bove, 1982). Eventuelle positive Effekte auf die durch GME entstandenen Schäden konnten experimentell nur nach Barbiturat- (Hoffman et al., 1998; Patel et al., 1998) und Lidocaingaben (Dutka et al., 1992; Rasool et al., 1990) nachgewiesen werden. Heparin war lediglich prophylaktisch, appliziert bei Embolisationen mit großen Gasbläschen wirksam (Ryu et al., 1996). Auch fluorkarbonhaltige Emulsionen, die für viele Gase ein hohes Gasauflösungsvermögen besitzen, zeigten experimentell deutliche Verbesserungen im Hinblick auf die Infarktgrößen und Mortalität nach Gasembolisationen (Lutz und Hermann, 1984; Spiess et al., 1988; Lynch et al., 1989; Cochran et al., 1997). Zusätzlich verbessern sie den Sauerstofftransport im Blut (Spahn, 2000).

1.2 „Nützliche“ Gasbläschen: Echokontrastverstärker

1.2.1 *Kurze Geschichte der Echokontrastverstärkung*

1963 beobachteten Joyner und Mitarbeiter während der Gabe von Indocyaningrün in die Herzen von Patienten mit jeder erneuten Injektion eine Kontrastverstärkung des Ultraschallechos. Gramiak und Shah nutzten diese Kontrastverstärkung 1968 zum ersten Mal gezielt zur diagnostischen Darstellung der Aortenwurzeln kardiologischer Patienten, indem sie isotone Kochsalzlösung in die Herzen injizierten. Durch die Injektion entstanden an der Spitze der Injektionsnadel Turbulenzen, die im Blut Kavitationen, das heißt kleine, gasgefüllte Hohlräume, entstehen ließen. Die Ultraschallwellen werden an diesen kleinen Gasbläschen verstärkt gestreut und reflektiert, wodurch es zur Kontrastverstärkung kommt (Kremkau et al., 1970). Für den Einsatz in der neurologischen Ultraschalldiagnostik eignete sich die zunächst eingesetzte Kochsalzlösung, in welche die Bläschen durch Aufschütteln gebracht wurden, jedoch nicht, da diese nicht-gekapselten Bläschen unterschiedlichster Größe spätestens in der Lunge abgebaut wurden (Della Martina et al., 2005). Während der 1980er Jahre wurden schließlich die ersten Echokontrastverstärker entwickelt, deren Mikrobläschen auch die Lungenpassage überlebten. Um dies zu erreichen, wurden beispielsweise die Luft-Mikrobläschen des ersten zugelassenen diagnostischen Echokontrastverstärkers Albunex® der Firma Molecular Biosystems (San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) mit humanem Serum-Albumin umhüllt und damit stabilisiert (Christiansen et al., 1994; Feinstein et al., 1984 und 1990).

Heute gibt es für die unterschiedlichsten Indikationsgebiete eine Vielzahl an Echokontrastverstärkern. So unter anderem auch zwei Kontrastmittel, die den Anforderungen für den Einsatz in der Neurosonografie gerecht werden und dafür zugelassen sind (Droste, 2008).

1.2.2 Eigenschaften und Wirkweise der Echokontrastverstärker

1.2.2.1 Eigenschaften

Generell dürfen Echokontrastverstärker nicht toxisch sein, sollten peripher intravenös injiziert werden können, ohne dass sie direkt in der Lunge wieder abgebaut werden und müssen stabil genug sein, um für die Untersuchung lange genug im Blutkreislauf zu zirkulieren (Correas et al., 2001).

Nur Gasbläschen mit einem Durchmesser kleiner als die Kapillaren können ungestört durch das Gefäßsystem zirkulieren (Lindner et al., 2002). Diese ungestörte Zirkulation ist vor allem auch für den erwünschten Lungentransit von höchster Bedeutung. Als besonders geeignet hat sich eine Bläschengröße zwischen 2 und 8 μm erwiesen, womit diese Mikrobläschen kleiner als rote Blutkörperchen sind. Weiterhin haben sich bei vielen Präparaten perfluorhaltige Gase aufgrund ihres niedrigen Diffusionskoeffizienten in Flüssigkeiten durchgesetzt. Um die Zirkulationsdauer der Mikrobläschen zu erhöhen und ihren Abbau zu verzögern, wurden sie ferner mit unterschiedlichsten Hüllen sowie mit oder ohne zusätzlichen oberflächenaktiven Stoffen stabilisiert (Correas et al., 2001; Stewart und Sidhu, 2006).

Ferner gibt es beispielsweise auch Echokontrastverstärker, die ihren Aggregatzustand von flüssig zu gasförmig ändern. Die Aggregatsänderung tritt entweder bei der Injektion in den Körper ein (beispielsweise durch das Erreichen ihres Siedepunkts bei einer Körpertemperatur von 37°C wie bei EchoGen®) oder wird durch die Bestrahlung mit ausreichend starken Ultraschallwellen erreicht. Dadurch wird die Stabilität des Kontrastmittels sowohl vor als auch nach der Injektion erhöht (Stride, 2009).

Eine Übersicht klinisch genutzter Echokontrastverstärker und ihrer Zusammensetzung findet sich in Tabelle (Tab.) 2-1.

Handelsname (Hersteller)	Gas	Hülle
Albunex® (Molecular Biosystems, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten)	Luft	Humanes Serumalbumin
Echovist® (Schering AG, Berlin, Deutschland)	Luft	Galaktosemikro-kristalle
Levovist® (Schering AG, Berlin, Deutschland)	Luft	Galaktosemikro-kristalle (mit 0,1% Palmitinsäure als Surfactant)
SonoVue® (Bracco Research S.A., Plan-les-Ouates, Genf, Schweiz)	Schwefelhexafluorid (SF ₆)	Phospholipid
Definity® (Bristol-Myers Squibb, New York City, New York, Vereinigte Staaten)	Oktafluorpropan (C ₃ F ₈)	Phospholipid-Doppelschicht
Optison® (Amersham Health (GE Healthcare), Amersham, England)	Oktafluorpropan (C ₃ F ₈)	Humanes Serumalbumin
Sonazoid® (Amersham Health (GE Healthcare), Amersham, England)	Dekafluorbutan (C ₄ F ₁₀)	Phospholipid
Imagify® (Acusphere, Inc., Lexington, Massachusetts, Vereinigte Staaten)	Dekafluorbutan (C ₄ F ₁₀)	Poly(glyco-co-Milchsäure) und Surfactant
Imagent® (Imcor Pharmaceutical Co., San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten)	Perfluorhexan (C ₆ F ₁₄) und Luft	Phospholipid und Surfactant
CardioSphere® (Point Biomedical, San Carlos, Kalifornien, Vereinigte Staaten)	Stickstoff (N ₂)	Albumin-Polymer-Doppelschicht
Echokontrastverstärker mit Änderung des Aggregatzustandes		
EchoGen® (Sonus Pharmaceuticals Inc., Bothell, Washington, Vereinigte Staaten)	Dodecafluorpentan (C ₅ F ₁₂)	Surfactant

Tab. 2-1: Auswahl an Ultraschallkontrastverstärkern und ihre Zusammensetzung

1.2.2.2 *Wirkweise*

Treffen Schallwellen auf die Mikrobläschen, kommt es aufgrund der durch die Höhe der Amplitude verursachten Druckänderungen in der Umgebung abwechselnd zur Ausdehnung und Kompression der Bläschen (Stride, 2009).

Bei Schall mit niedrigen Amplituden, das heißt niedrigem Druck, zeigen die Mikrobläschen stabile symmetrische Schwingungen (das heißt die Ausdehnung entspricht in ihrem Umfang der nachfolgenden Kompression) mit kleinen Amplituden und derselben Frequenz wie der auftreffende Schall. Man spricht hier von linearem Schwingungsverhalten (Stride, 2009).

Mit steigender Amplitude und damit auch steigendem Druck fällt die Ausdehnung der Mikrobläschen viel stärker aus als ihre Kompression, es kommt zu asymmetrischen Schwingungen und zum nicht-linearen Verhalten der Bläschen. Durch dieses Verhalten hat der reflektierte Schall der Mikrobläschen nicht nur die gleiche Frequenz wie die Ausgangsfrequenz des auftreffenden Schalls, sondern beinhaltet nun auch Unter- und Oberschwingungen mit einem Bruchteil beziehungsweise einem Vielfachen der Ausgangsfrequenz (Stride, 2009). In beiden Fällen bleibt die Hülle der Mikrobläschen intakt. Je geringer deren Viskosität und Rigidität ist, desto besser ist die Echogenität der Mikrobläschen, da dadurch die für die Ausdehnung und die Kompression notwendige Elastizität der Bläschen gewährleistet wird und so höhere Schwingungsamplituden erreicht werden können (Della Martina et al., 2005). Die Zusammensetzung der Hülle hat demzufolge großen Einfluss auf die Schalleigenschaften der Mikrobläschen (Stride, 2009).

Erst bei der Überschreitung eines bestimmten Drucks verhalten sich die Mikrobläschen unabhängig ihrer Hülle wie nicht-ummantelte Gasbläschen und zeigen dann zwar im hohen Maße nicht-lineare, dafür aber sehr stabile Schwingungen. Dadurch nimmt der Anteil der zur Ausgangsfrequenz passenden reflektierten Frequenzen wieder zu. Man spricht hier auch von der Entstehung stabiler Kavitationen (Stride, 2009), da sie über längere Zeit im Schallfeld schwingen. Neben den stabilen Kavitationen existieren auch sofort wieder kollabierende, transiente Kavitationen (Nedelmann et al., 2008a).

Bei weiterer Erhöhung des Drucks dehnen sich die Bläschen zunächst so massiv aus, dass der Druck in ihrem Inneren dem Druck der sie umgebenden Flüssigkeit nicht mehr standhalten kann. Die Bläschen zerplatzen (Stride, 2009), was durch die zusätzliche Energiefreisetzung zu einem kurzzeitigen, starken Echo führt (Harvey et al., 2001; Blomley et al., 2001; Leen, 2001; Stride, 2009). Man spricht von inerten, trägen Kavitationen (Stride, 2009).

Wichtig für die gewünschte Kontrastverstärkung ist der Zusammenhang zwischen der Größe der Mikrobläschen und der gewählten Wellenlänge des Ultraschalls. Bei Bläschen, die kleiner sind als menschliche Kapillaren ($<8 \mu\text{m}$) wird die stärkste Kontrastverstärkung mit Ultraschallfrequenzen erreicht, die in der normalen Ultraschalldiagnostik ihre Verwendung finden (1 bis (15)20 MHz und mehr) (Stewart und Sidhu, 2006; Stride, 2009).

1.2.2.3 Weitere physikalische Effekte

Gerät ein Bläschen in den Ultraschallstrahl, so kommt es durch Impulsübertragungen der Schallwellen auf das Mikrobläschen zu einer Änderung in der Bewegungsrichtung des Bläschens. Stride et al. (2009) machen dieses Phänomen für die Entstehung sogenannter „Microstreams“ verantwortlich. Bläschen können damit auch in eine gewünschte Richtung gelenkt werden. In *in vitro*-Versuchen konnten Bläschen derart stark beschleunigt werden, dass sie sich in regelrechte Geschosse verwandelten und die Zellen in ihrer „Schussbahn“ beim Auftreffen zerstörten (Starritt et al., 1991; Miller et al., 1991).

Ein gleichmäßiger Bläschenfluss in der Richtung des Ultraschallstrahls erzeugt *in vivo* unter anderem Scherkräfte auf die umliegenden Gewebe und Zellen. Mehrere experimentelle Studien konnten zeigen, dass diese Scherkräfte die Aufnahme von Substanzen, die sich ebenfalls in diesem Strom befinden, in die umliegenden Zellen fördern (Marmottant und Hilgenfeldt, 2003; Marmottant et al., 2008). Bei schnelleren „Microstreams“ können unter Umständen auch direkte Zell- und Gewebeschäden entstehen (Clarke und Hill, 1970; Rooney, 1970; Ward et al., 1999).

Des Weiteren existieren auch sogenannte „Microjets“. Platzt ein Bläschen in der Nähe einer rigideren Oberfläche, beispielsweise einer Zellmembran, so entsteht ein Energiestrahle, der sich in Richtung der anderen Oberfläche fortpflanzt und diese punktieren kann. Auch hierdurch kann unter Umständen die Aufnahme von Substanzen in die Zelle gefördert werden. Außerdem kann die beim Platzen freiwerdende Energie in Form einer Schockwelle auch direkt das umliegende Gewebe beschädigen (Stride et al., 2009).

1.2.3 Einsatz in der Neurologie

Von den in Tab. 2-1 aufgezählten Echokontrastverstärkern sind Levovist® und SonoVue® für den Einsatz in der Neurosonografie zugelassen (Droste, 2008). Bei beiden gibt es beim Einsatz in der neurosonografischen Diagnostik an sich keine Berichte über unerwünschte Wirkungen (Gebel et al., 1998; Droste et al., 2002; Droste, 2008; Greis, 2004).

Echokontrastverstärker ermöglichen bei transkraniellen Farbdoppler-Untersuchungen die verbesserte Darstellung der zerebralen Makro- und Mikrozirkulation und die Messungen des relativen Gefäßvolumens sowie der Fließgeschwindigkeit des Blutes und der Gehirnperfusion (Della Martina et al., 2005; Stride, 2009; Bleeker et al., 1990; Droste, 2008). Sie werden in der humanmedizinischen Neurologie unter anderem zur Beurteilung der Karotisdurchblutung/-stenosierung, zur Überprüfung der Wirksamkeit anti-atherosklerotischer Therapien und zur Einschätzung des Risikos eines Schlaganfalles verwendet (Stewart und Sidhu, 2006; Droste, 2008). Weiterhin finden sie ihre Anwendung bei der Diagnostik und der Einschätzung von Schlaganfall-Patienten (Mears, 2008) und können darüber hinaus auch dafür verwendet werden, um über die durch sie verursachten Störungen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) den Transport von Wirkstoffen über die BHS in das Gehirn zu gewährleisten (Wiedemair et al., 2012; Price et al., 1998; Mychaskiw et al., 2000).

Weiterhin finden mikrobäschenhaltige Präparate ihren Einsatz in der Sonothrombolyse zur Therapie ischämischer Schlaganfälle. In unzähligen experimentellen und klinischen Studien konnte die Rekanalisierungsrate verschlossener Gehirngefäße verbessert, die Zeit bis zur Rekanalisierung signifikant verkürzt (Nedelmann et al., 2002; Cintas et al., 2004; Meairs und Culp, 2009; Tachibana und Tachibana, 1995), die Infarktgrößen und das Gehirnödem reduziert und die Perfusion der Mikrozirkulation deutlich verbessert werden (Nedelmann et al., 2010).

2. Der Schlaganfall

2.1 Der Schlaganfall des Menschen

Die Definition des Schlaganfalles laut Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) lautet folgendermaßen: „Sich rasch entwickelnde klinische Symptome einer fokalen (oder globalen) Störung der zerebralen Funktion, die 24 Stunden oder länger anhalten oder zum Tode führen und die offensichtlich vaskulären Ursprungs sind.“ (WHO MONICA Project Investigators, 1988). Bei einem Schlaganfall handelt es sich also um die Störung der gehirnversorgenden Gefäße, die mit perakuten klinisch-neurologischen Symptomen entsprechend des betroffenen Versorgungsgebietes im Gehirn einhergeht. Zeigen sich die Symptome weniger als 24 Stunden, spricht man von einer transitorischen ischämischen Attacke (TIA) (Donnan et al., 2008). Sind die Symptome länger vorhanden oder verstirbt der Patient an den Folgen der zerebralen Zirkulationsstörung, so spricht man vom Schlaganfall. Ungefähr 80 bis 88% aller Schlaganfälle sind bedingt durch zerebrale Minderdurchblutungen (ischämischer Schlaganfall), die restlichen 12 bis 20% haben ihren Ursprung in intrakraniellen sowie intrazerebralen Blutungen (hämorrhagischer Schlaganfall) (Thrift et al., 2001; Casals et al., 2011).

Jährlich ereignen sich deutschlandweit ungefähr 262.000 Schlaganfälle. Davon wiederum enden zirka 63.000 tödlich (Stand 2008). Nach Schätzungen der WHO rangiert der Schlaganfall weltweit auf Platz 2 der Todesursachen (geschätzte 5,5 Millionen Tote im Jahr 2002) und ist eine der häufigsten Ursachen für erworbene Behinderungen im Erwachsenenalter. In Deutschland nimmt der Schlaganfall den dritten Platz in der Todesursachenstatistik nach Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen ein. Die Inzidenz eines Schlaganfalles ist bei Männern größer als bei Frauen. Da jedoch vorwiegend ältere Personen betroffen sind – in Europa ereignen sich 50% der erstmaligen Schlaganfälle bei Personen älter als 73 Jahren – sind aufgrund ihrer höheren Lebenserwartung absolut betrachtet mehr Frauen von Schlaganfällen betroffen (Heuschmann et al., 2010).

Risikofaktoren für einen Schlaganfall sind unter anderem Rauchen, Bewegungsmangel und übermäßiger Alkoholkonsum, Diabetes und Fettstoffwechselstörungen, kardiale Krankheiten wie beispielsweise Vorhofflimmern, Karotisstenosen, Bluthochdruck und Gerinnungsstörungen sowie vorangegangene transitorische ischämische Attacken und Atherosklerose. Auch eine genetische Komponente wird diskutiert, zudem spielen das Alter und das Geschlecht eine Rolle (Donnan, 2008; Garosi und McConnell, 2005).

2.2 Der Schlaganfall in der Veterinärmedizin

Laut Platt und Garosi (2003) sollte grundsätzlich an einen Schlaganfall gedacht werden, wenn sich bei einem Hund perakute Symptome einer nicht-fortschreitenden Dysfunktion des Gehirnes zeigen. Diese Feststellung ist sicher auf andere Tierarten übertragbar. So kommt es auch bei Katzen mit Schlaganfall zum akuten Auftreten klinisch-neurologischer Symptome, wie Altay und Mitarbeiter (2011) zeigen konnten.

Berichte über Schlaganfälle bei Tieren finden sich in der Literatur allerdings recht selten. Es gibt Fallberichte beim Hund (Platt und Garosi, 2003; Garosi et al., 2005; Negrin et al., 2009; Gonçalves et al., 2011; Cachin und Vandeveld, 1990; Kotani et al., 1975; Joseph et al., 1988), seltener bei Katze (Altay et al., 2011; Cherubini et al., 2007) und Pferd (Fey et al., 2007). Meist handelt es sich um die Sektionsergebnisse daran verstorbener oder euthanasierter Tiere. Mit dem Aufkommen modernerer diagnostischer Möglichkeiten wie der Magnetresonanztomografie und der Computertomografie in größeren Tierkliniken werden ischämische Hirninfarkte mittlerweile jedoch auch öfter bei noch lebenden Tieren festgestellt (Garosi und McConnell, 2005; Altay et al., 2011).

2.3 Pathophysiologie des akuten ischämischen Schlaganfalls

2.3.1 Ischämischer Zelluntergang

Ischämische Schlaganfälle resultieren aus einer vorübergehenden oder andauernden Reduktion des zerebralen Blutflusses. Diese Durchblutungsstörung wird in den meisten Fällen durch die Okklusion einer zerebralen Arterie mit einem Embolus oder einer lokalen Thrombose verursacht (Donnan et al., 2008).

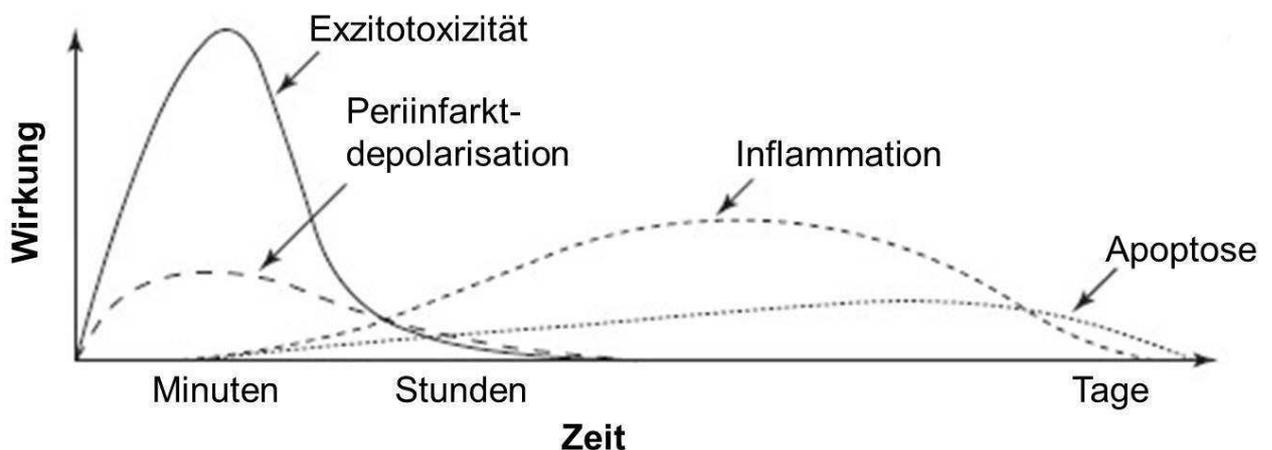


Abb. 2-1: Zeitlicher Ablauf der Hauptpathomechanismen in der neurochemischen Kaskade nach ischämischem Schlaganfall (nach Dirnagl et al., 1999)

Bei der Entstehung des ischämischen Hirnschadens läuft eine regelrechte neurochemische Kaskade im Gehirn ab, deren Hauptpathomechanismen die Exzitotoxizität, die Periinfarktdepolarisation, die Inflammation und der programmierte Zelltod (Apoptose) sind (Abbildung (Abb.) 2-1) (Dirnagl et al., 1999).

Aufgrund seiner hohen Stoffwechselrate ist das Gehirngewebe recht anfällig für Beeinträchtigungen seiner Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen (vor allem Glukose). Unterbricht diese Versorgung wegen der Blockade eines Gefäßes, so kann das betroffene Gehirngewebe seine Energieproduktion nicht mehr aufrechterhalten (Dirnagl et al., 1999). Es kommt zu Störungen in der Ionenhomöostase (Martin et al., 1994) und zum Verlust des Membranpotentials. Die Neuronen und Gliazellen depolarisieren (Katsura et al., 1994) und exzitatorische Aminosäuren wie Glutamat werden aus den Zellen freigesetzt und akkumulieren im extrazellulären Raum. Dort aktivieren sie die unterschiedlichsten Kanäle und Signalwege und greifen unter anderem auch in die Steuerung der Expression von Genen ein, die für die postischämische Inflammation verantwortlich sind. Diese Mechanismen können zum einen direkt den akuten Zelltod (Nekrose) verursachen, zum anderen über weitere Signalwege den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. Man spricht hier auch von Exzitotoxizität, für die hauptsächlich das Glutamat verantwortlich ist (Dirnagl et al., 1999).

Durch die exzitotoxische Wirkung gelangen unter anderem auch vermehrt Natrium- und Chloridionen in die Neuronen, wohingegen Kalium sich extrazellulär anreichert. Dem Natrium- und Chloridionenstrom folgt passiv Wasser in die Zellen (Dirnagl et al., 1999), wodurch das intrazelluläre, zytotoxische Gehirnödem entsteht. Dieses führt bereits innerhalb weniger Minuten nach dem aufgetretenen Gefäßverschluss zu nachweisbaren Änderungen des apparenten Diffusionskoeffizienten (engl. apparent diffusion coefficient, ADC) in der Magnetresonanztomografen (MRT)-Bildgebung und ist damit in diffusionsgewichteten MRT-Bildern bereits in der Akutphase des Infarktes visualisierbar (Gerriets et al., 2004b).

Das zytotoxische Gehirnödem kann bei starker Ausprägung auch die Perfusion des dem Infarktgebiet angrenzenden Gewebes negativ beeinträchtigen und zudem den intrakraniellen Druck erhöhen. Dieser wiederum führt zu weiterer Kompression von Gefäßen und im schlimmsten Fall auch zur Herniation von Gehirngewebe (Dirnagl et al., 1999).

2.3.2 Penumbra

Im Infarktkern kommt es zum raschen Tod der dortigen Zellen durch Nekrose (Dirnagl et al., 1999). Dieses ischämische Kerngebiet wird von funktionell zwar beeinträchtigtem, aber strukturell noch intaktem Gewebe umgeben, der Penumbra (Fisher und Garcia, 1996). Der Nachweis der Penumbra gelingt bis zu 24 Stunden nach dem Infarkt unter anderem mit dem MRT. Das ischämische Kerngebiet zeigt sich in der diffusionsgewichteten Bildgebung als zelluläres Ödem. Darüber hinaus gibt es in der perfusionsgewichteten Bildgebung eine in der Regel deutlich größere Region mit reduzierter Durchblutung. Zieht man nun die Region des Infarktkerns von der größeren Region mit reduzierter Perfusion ab, so ergibt sich daraus die Zone der Penumbra (Donnan et al., 2008).

Wie oben erwähnt, kommt es durch Veränderungen des Ionengleichgewichtes zur Depolarisation der umliegenden Zellen (Katsura et al., 1994). Die Zellen im Infarktkern bleiben in diesem depolarisierten Zustand, wohingegen die Zellen der Penumbra auch unter Verbrauch weiterer Energie repolarisieren können. Dieselben Zellen depolarisieren jedoch auch wieder aufgrund der extrazellulär ansteigenden Glutamat- und/oder Kaliumionenkonzentration, können unter Energieverbrauch wieder repolarisieren und anschließend wieder depolarisieren. Diese sich wiederholenden Vorgänge werden auch Periinfarktdepolarisationen genannt (Hossmann, 1996). Sie treten mehrmals pro Stunde auf und können bis zu sechs bis acht Stunden nachgewiesen werden. Mit jeder Periinfarktdepolarisation wird dabei das Infarktgebiet größer (Mies et al., 1993), in welchem bereits der Endzustand der nach neurochemischen Kaskade erreicht ist. Dieser Infarktkern ist therapeutisch auch nicht mehr zu retten. In der Penumbra hingegen läuft die postischämische Kaskade noch ab (Donnan et al., 2008), die Zellen dieser Region sind größtenteils für einige Stunden nach dem Schlaganfall noch nicht abgestorben (Ma et al., 2009;

Lansberg et al., 2011). Das Primärziel der Neuroprotektion ist daher der Schutz und die Rettung dieses Gebietes (Dirnagl et al., 1999; Donnan et al., 2009; Heiss, 2011) und die beste Option, dieses Ziel zu erreichen, scheint derzeit die Wiederherstellung des Blutflusses in das ischämische Areal durch die Thrombolyse, das heißt die Auflösung und/oder die Entfernung des Gerinnsels (Gursoy-Özdemir et al., 2012).

2.4 Therapiemöglichkeiten thrombotisch-embolischer Gefäßverschlüsse

2.4.1 Pharmakologische Thrombolyse

Das Gehirngewebe zeigt wie erwähnt gegenüber hypoxischen Zuständen recht wenig Toleranz. Hieraus resultiert das enge Zeitfenster in der Therapie zerebraler Minderdurchblutungen und Gefäßverschlüssen (Nedelmann et al., 2008). Das einzige derzeit für die Therapie akuter ischämischer Schlaganfälle zugelassene Verfahren ist die systemische intravenöse (Thrombo-)Lysetherapie mit dem Fibrinolytikum rt-PA (rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator, auch: Alteplase; engl. recombinant tissue-type plasminogen activator) (Hacke et al., 1995, 1998 und 2004; Clark et al., 1999).

In Deutschland werden damit jedoch lediglich 7 bis 10 % der Schlaganfallpatienten behandelt (Heuschmann et al., 2010). Die Gründe dafür liegen in dem für eine erfolgreiche rt-PA-Lysetherapie kleinen Zeitfenster von 3 bis 4,5 Stunden nach Auftreten der Gefäßokklusion sowie häufigen Kontraindikationen gegen den Einsatz von rt-PA bei den Patienten (Nedelmann et al., 2008a; Lees et al., 2010; Donnan et al., 2011; Hacke et al., 2008). Zudem ist auch die frühe Rekanalisierung trotz zeitig erfolgter intravenöser Lysetherapie nicht immer vollständig möglich (Saver, 2011). Weiterhin kann es bei Patienten nach rt-PA-Gaben zu symptomatischen intrazerebralen Blutungen kommen (Donnan et al., 2011; Donnan et al., 2008). Die Gefahr des Auftretens dieser Blutungen steigt mit zunehmendem Patientenalter und bei Bluthochdruck sowie bei Patienten, die nach dem Schlaganfall mit schweren neurologischen Defiziten und hoher Hyperglykämie eingeliefert werden (Larrue et al., 1997; Fiorelli et al., 1999).

Studien haben ergeben, dass lediglich jeder siebte Patient, der mit rt-PA lysiert wurde, den Schlaganfall ohne alltagsrelevante Behinderungen übersteht (Hacke et al., 2004). Diese beschränkte Effektivität und die stark begrenzten Einsatzmöglichkeiten der intravenösen Thrombolyse mit rt-PA machen die Entwicklung neuer Therapieansätze nötig.

2.5 „No Reflow“-Phänomen

In den späten 1960er und 1970er Jahren berichteten mehrere Studien von einem beeinträchtigten Rückfluss des Blutes in die Mikrozirkulation nach zerebraler Ischämie. Diese Erscheinung wurde als „No Reflow“-Phänomen bekannt (Ames et al., 1968; Crowell und Olsson, 1972; Little et al., 1975; Little et al., 1976). Auch in experimentellen Studien konnte trotz der erfolgreichen Rekanalisierung großer Gefäße eine anhaltende Perfusionsstörung der Mikrozirkulation beobachtet werden (Dawson et al., 1997; Okada et al., 1994).

Bereits eine Stunde nach der Okklusion einer Gehirnarterie kommt es zur Vasokonstriktion der Kapillaren. Die vorgeschalteten Arteriolen bleiben dagegen dilatiert (Little et al., 1976; Belayev et al., 2002). Die verengten Kapillarlumina sind angefüllt mit den korpuskulären Blutbestandteilen und Fibrinablagerungen (Little et al., 1976; del Zoppo et al., 1991; Garcia et al., 1994; Choudhri et al., 1998; Zhang et al., 1999; Morris et al., 2000) und werden so nicht mehr adäquat perfundiert (Anwar et al., 1988; del Zoppo et al., 1991; Belayev et al., 2002). Verschlimmert werden diese Perfusionsstörungen der Mikrozirkulation weiterhin durch die Tatsache, dass die den Kapillaren nachgeschalteten Venolen meist ebenfalls verstopft sind (Hallenbeck et al., 1986; del Zoppo et al., 1991; Garcia et al., 1994; Ritter et al., 2000; Belayev et al., 2002).

Daher sollte das Augenmerk der Therapie ischämisch-embolischer Schlaganfälle zusätzlich zur rekanalisierenden Thrombolyse auch auf der Wiederherstellung der Mikrozirkulation liegen (Gursoy-Özdemir et al., 2012).

3. Therapeutischer Ultraschall beim Schlaganfall (Sonothrombolyse)

3.1 Grundlagen des Ultraschalls

Das menschliche Gehör ist in der Lage, Frequenzen zwischen 20 Hz und 20 kHz wahrzunehmen. Sämtliche Schallwellen größer als 20 kHz werden daher als Ultraschall bezeichnet. Normalerweise werden in der medizinischen Bildgebung Frequenzen zwischen 1 und 40 MHz verwendet. Diese Schallwellen werden dann nicht mehr über die Luft, sondern über feste und flüssige Materialien übertragen. Die Ultraschallsonde dient dabei gleichzeitig als Sender und Empfänger und das Signal besteht normalerweise aus einem Puls über mehrere μ s mit einer definierten Frequenz. Dieses ausgesendete Signal geht teilweise durch die Gewebe durch, wird teilweise reflektiert und teilweise gestreut. Dementsprechend ist das zurückkommende Signal gewebetypisch verändert und kann in ein entsprechendes Ultraschallbild umgewandelt werden (Wells, 1999; Postema und Gilja, 2011).

In der klinischen Anwendung wird die Intensität des Ultraschallfeldes anstelle der akustischen Amplitude mittels des mechanischen Indexes (MI) bestimmt. Ein MI kleiner 0,3 bedeutet eine kleine akustische Amplitude. Bei einem MI zwischen 0,3 und 0,7 spricht man von moderaten akustischen Amplituden, welche bereits Schäden an neonatalen Lungen und Eingeweiden verursachen und bei einem MI über 0,7 kommt es zu hohen akustischen Amplituden. Je höher der MI ist, desto kontrastreicher, aber auch risikoreicher wird die Bildgebung (Postema und Gilja, 2011). Bei den derzeit in der Diagnostik üblichen Ultraschallgeräten ist daher der MI auf 1,9 begrenzt (Voigt et al., 2009).

3.2 Geschichte der Sonothrombolyse

1976 gelang es Trübestein et al., Blutgerinnsel *in vitro* mittels Ultraschall aufzulösen. Die transkranielle Anwendung des therapeutischen Ultraschalls wurde schließlich Ende der 1990er Jahre erprobt (Akiyama et al., 1998; Behrens et al., 1999), der erste Bericht über die klinische Verbesserung der rt-PA-Wirkung bei gleichzeitiger Doppler-Untersuchung der Rekanalisierung von Schlaganfallpatienten stammt aus dem Jahr 2000 (Alexandrov et al.).

Es folgten mehrere kontrollierte Pilotstudien mit der Verwendung von Ultraschall im diagnostischen MHz-Bereich. Bei der CLOTBUST (Combined Lysis Of Thrombus in Brain ischemia using transcranial Ultrasound and Systemic Tpa)-Studie führte die rt-PA-Gabe in Verbindung mit der transkraniellen 2 MHz-Doppler-Beschallung zu signifikant verbesserten Rekanalisierungsraten im Vergleich zur alleinigen Therapie mit rt-PA. Dabei konnte keine erhöhte Rate an Hirnblutungen nachgewiesen werden (Alexandrov et al., 2004).

Zwei andere Studien konnten bei der gleichzeitigen Anwendung von MHz-Ultraschall und der Gabe von rt-PA bei Schlaganfallpatienten ebenfalls die Verbesserung bei den Rekanalisierungen feststellen, berichteten jedoch von einer erhöhten Rate an symptomatischen Blutungen (Eggers et al., 2003 und 2008).

3.3 Wirkprinzip der Sonothrombolyse

Obwohl es eine Vielzahl an Studien gibt, welche die Wirksamkeit der Thrombolyse mittels Ultraschall bestätigen, ist das zugrundeliegende Wirkprinzip noch nicht vollständig geklärt (Meairs et al., 2012).

Bei der Ultraschallbehandlung von Flüssigkeiten kommt es zur Entstehung von Gasbläschen in der Flüssigkeit. Wie erwähnt lassen diese sich durch den Ultraschall zu inerten (Platzen der Bläschen) oder stabilen Kavitationen (starken, harmonischen Schwingungen) anregen, es entstehen „Microjets“ und „Microstreams“ (Meairs et al., 2012).

Auch wenn durch das Platzen der Bläschen vermehrt „Microjets“ entstehen, welche die Oberfläche des Blutgerinnsels erodieren können (Everbach und Francis, 2000), scheint die Sonothrombolyse mit stabilen Kavitationen wirksamer zu sein (Datta et al., 2006). Die durch den Ultraschall verursachten „Microstreams“ erleichtern sowohl das Eindringen von rt-PA in den Thrombus als auch die Bindung von rt-PA an das Fibringerüst (Siddiqi et al., 1998; Daffertshofer und Hennerici, 2003; Francis et al., 1995). Schnelle „Microstreams“ der schwingenden Gasbläschen können unter Umständen auch direkte (Zell-)Schäden verursachen (Clarke und Hill, 1970; Rooney, 1970; Ward et al., 1999). Diese Mikroläsionen sind dann vielleicht auch bei der Sonothrombolyse dafür verantwortlich, dass das Blutgerinnsel leichter und schneller zerstört wird (Prokop et al., 2007).

Allerdings kommt es lediglich bei der Verwendung von niederfrequentem Ultraschall (kHz-Bereich) zu der Entstehung von Kavitationen in Flüssigkeiten und damit auch im Blut. Im von diagnostischen Ultraschallgeräten verwendeten MHz-Bereich konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Nedelmann (2010) vermutet daher, dass es bei der transkraniellen therapeutischen Anwendung des MHz-Ultraschalls zur Aktivierung des gewebeeigenen Plasminogen-Aktivators und damit zur Beschleunigung der intrinsischen enzymatischen Fibrinolyse kommt – analog zu den durch die Lysetherapie mit rt-PA verursachten Effekten. Außerdem werden vermutlich auch die Wirkstoffmoleküle des rt-PA durch die Druckwellen des Ultraschalls vermehrt in das Gerinnsel transportiert (Francis et al., 1995).

Um bei der Verwendung diagnostischer Ultraschallfrequenzen im MHz-Bereich die Effekte der Mikrobläschen bei der Sonothrombolyse nutzen zu können, müssen sie demnach von extern in das Gefäßsystem gebracht werden.

3.4 Mikrobläschenverstärkte Sonothrombolyse

In vielen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die zusätzliche Gabe von mikrobläschenhaltigen Ultraschallkontrastverstärkern die thrombolytische Wirkung der Kombination diagnostischer Ultraschall (MHz) und rt-PA forciert und verbessert (Nedelmann et al., 2002 und 2010; Cintas et al., 2004; Meairs und Culp, 2009; Tachibana und Tachibana, 1995).

Die erste klinische Studie dazu wurde im Jahr 2006 publiziert. Die beiden Patientengruppen der bereits erwähnten CLOTBUST-Studie (transkranieller 2 MHz-Dopplerultraschall mit rt-PA (Sonothrombolysegruppe) oder nur rt-PA) wurden mit einer weiteren Gruppe verglichen, die zusätzlich zu den rt-PA-Gaben und der Ultraschalltherapie das Mikrobläschenpräparat Levovist® erhalten hatte (Mikrobläschengruppe). Im Vergleich zur Sonothrombolysegruppe war die Rate an kompletten Rekanalisierungen in der Mikrobläschengruppe signifikant höher sowie die Zeit bis zur Rekanalisierung deutlich verkürzt. In der Mikrobläschengruppe gab es keine Hinweise auf vermehrt symptomatische Blutungen (Molina et al., 2006). Eine weitere Studie mit dem Ultraschallkontrastverstärker SonoVue® konnte ebenfalls ohne vermehrte symptomatische Hämorrhagien eine signifikant verbesserte frühe Reperfusion in der Mikrobläschengruppe nachweisen. Hier war jedoch nach einer Stunde kein Unterschied in der Anzahl der komplett rekanalisierten Gefäße im Vergleich zur Sonothrombolysegruppe zu erkennen (Perren et al., 2008).

Die multizentrisch durchgeführte MUST-Studie (Microbubbles and Ultrasound in Stroke Trial) wurde hingegen frühzeitig beendet, nachdem es in der Mikrobläschengruppe (SonoVue®) zum erhöhten Vorkommen an zerebralen, asymptomatischen hämorrhagischen Transformationen gekommen war (77,8% gegenüber 36,4%; $p = 0,09$) (Larrue et al., 2007). Dieses vermehrte Vorkommen asymptomatischer hämorrhagischer Transformationen bei mikrobläschenverstärkter Sonothrombolyse konnte auch durch eine weitere Studie bestätigt werden. Bezüglich des Auftretens symptomatischer Hirnblutungen wurde jedoch kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt. Die asymptomatischen Blutungen konnten hingegen sogar in Zusammenhang mit erfolgreichen Rekanalisierungen gebracht werden (Dinia et al., 2009). Nedelmann (2010) vermutet daher, dass die nachgewiesenen asymptomatischen hämorrhagischen Transformationen Anzeichen der erfolgreichen Rekanalisierung und eben keine Nebenwirkungen der kontrastverstärkten Sonothrombolyse sind. Dafür spricht auch, dass sich bei erfolgreichen Rekanalisierungen bei der Thrombolyse mit rt-PA ebenfalls Hinweise auf hämorrhagische Transformationen finden lassen (Molina et al., 2002).

Dennoch dürfen vor allem die Sicherheitsaspekte bei der Sonothrombolyse und beim Einsatz neuer Mikrobäschenpräparate nicht außer Acht gelassen werden (Nedelmann, 2010). Die TUCSON-Studie (Transcranial Ultrasound in Clinical SONothrombolysis) wurde beispielsweise frühzeitig beendet, nachdem in einer Patientengruppe vermehrt symptomatische intrakranielle Blutungen aufgetreten sind. Bei dieser Studie wurde ein neues, speziell für Therapiezwecke entwickeltes Mikrobäschenpräparat (MRX-801, ImaRx Therapeutics, Inc., USA) in unterschiedlichen Dosierungen zusammen mit der Gabe von rt-PA und der transkraniellen Beschallung mit dem 2 MHz-Dopplerultraschall getestet. In der Dosisgruppe 2 (2,8 ml MRX-801) kam es bei 3 von 11 Patienten zu Blutungen, wohingegen es bei keinem der 12 Patienten der Dosisgruppe 1 (1,4 ml MRX-801) zu symptomatischen Hämorrhagien kam. Jedoch konnten trotz frühzeitigem Abbruch Hinweise auf den Therapieerfolg im Hinblick auf die nicht signifikant verbesserte komplette Rekanalisierungsrate (67% in Dosisgruppe 1 und 45% in Dosisgruppe 2 gegenüber 33% in der Kontrollgruppe) und die nicht signifikant verkürzte Zeit bis zur erfolgreichen Rekanalisierung (30 min in den Dosisgruppen gegenüber 60 min in der Kontrollgruppe (Medianwerte)) gefunden werden. Die nachgewiesenen symptomatischen Blutungen traten zudem auch nur bei Patienten auf, die entgegen ihres hohen Blutdrucks in die Studie aufgenommen worden waren (Molina et al., 2009).

Gerade Studien wie die TUSCON-Studie zeigen, wie wichtig die sorgfältige präklinische, (tier)experimentelle Evaluierung neuer Therapieverfahren ist.

3.5 Wahl des Ultraschallfrequenzbereiches

Die Experimente zur mikrobäschenverstärkten Sonothrombolyse wurden in der vorliegenden Arbeit mit dem in der medizinischen Diagnostik üblichen 3 MHz-Farb-Doppler-Ultraschall durchgeführt.

Der diagnostische Ultraschall im MHz-Bereich ist in seinen sonothrombolytischen Eigenschaften in *in vitro*-Studien gegenüber dem niederfrequentem Ultraschall zwar unterlegen (Nedelmann et al., 2005; Behrens et al., 2001; 40-42), gerade aber beim therapeutischen Einsatz *in vivo* gibt es mit dem Ultraschall im kHz-Bereich vermehrt

unerwünschte Wirkungen. So kommt es im Tiermodell bei der falschen Parameterwahl zu intrakraniellen Blutungen und zur Vergrößerung des Infarkt Volumens (Nedelmann et al., 2008b; Wilhelm-Schwenkmezger et al., 2007) und auch eine klinische Studie am Menschen mit niederfrequentem Ultraschall musste nach dem vermehrtem Auftreten von Blutungen aus Sicherheitsgründen abgebrochen werden (Daffertshofer et al., 2005). Beim klinisch-therapeutischen Einsatz von Ultraschall im MHz-Bereich treten dagegen weniger (Eggers et al., 2003 und 2008) bis gar keine unerwünschten Wirkungen auf (Alexandrov et al., 2000 und 2004).

4. Experimentelle Schlaganfallforschung

4.1 Tiere in der Schlaganfallforschung

Obwohl in der Vergangenheit auch mit höheren Säugetieren wie Katzen (lateinisch (lat.) *Felis silvestris catus*), Hunden (lat. *Canis lupus familiaris*), Schafen (lat. *Ovis orientalis avies*), Schweinen (lat. *Sus scrofa domestica*) und Primaten (lat. *Primates*) gearbeitet wurde (Ginsberg und Busto, 1989; Howells et al., 2010), bringen die in der experimentellen Schlaganfallforschung in der Regel verwendeten Nagetiere eine große Zahl an Vorteilen gegenüber den genannten anderen Tierarten mit. So hat ihre zerebrovaskuläre Anatomie große Ähnlichkeit mit der höherer Spezies (wie auch dem Menschen). Durch die geringe Probengröße gelingt auch die Probenfixierung für die späteren Untersuchungen besser. Zudem werden zur Auswertung und bei Wirkstofftestungen aufgrund der geringen Körpergröße weniger Verbrauchsmaterialien und Substanzen benötigt, was die Versuchskosten senkt. Auch die Unterbringung der Nagetiere ist viel kostengünstiger als beispielsweise die von Hunden. Ein weiterer wichtiger Grund ist auch die größere Akzeptanz bei der Verwendung dieser Tierspezies – sowohl eben aus ökonomischer, als aber auch aus ethischer Sicht (denkt man beispielsweise an die Verwendung von Primaten) (Ginsberg und Busto, 1989). Diese ethische Einstellung dem „Mitgeschöpf Tier“ gegenüber zeigt sich auch in der deutschen Gesetzgebung, denkt man an das seit 2002 im Grundgesetz (GG) der Bundesrepublik Deutschland verankerte Staatsziel

Tierschutz (§20 GG) und die Vorgaben des Tierschutzgesetzes (TierSchG) zur Durchführung von Tierversuchen (§§ 7-9a TierSchG).

Die in der experimentellen Schlaganfallforschung eingesetzten Nager waren lange Zeit hauptsächlich Ratten (lat. *Rattus norvegicus*) und Gerbils (lat. *Meriones unguiculatus*) und die mit diesen Tierarten und ihren -stämmen durchgeführten Modelle sind gut etabliert und reproduzierbar (Ginsberg und Busto, 1989; Small und Buchan, 2000). Erst mit dem Aufkommen gentechnisch veränderter Mauslinien (lat. *Mus musculus*) hat sich die Forschung auch dieser Spezies zugewandt. Dennoch gibt es gerade durch die Vielzahl der unterschiedlichen Mausstämme auch große Unterschiede in der zerebralen Gefäßanatomie und der Empfänglichkeit für Schlaganfälle, so dass sich nur einige wenige Mausstämme für die experimentelle Schlaganfallforschung eignen. Zudem ist die fehlende Arteria (A.) communicans posterior/caudalis (wie übrigens auch beim Gerbil) ein limitierender Faktor für den Einsatz dieser Spezies (Small und Buchan, 2000; Howells et al., 2010), weshalb weiterhin die Ratte eine wichtige Rolle in der Forschung spielt.

4.1.1 Rattenstamm- und Geschlechterwahl

In der vorliegenden Arbeit werden männliche Wistar-Unilever-Ratten (HsdCpb:WU) (WU) und männliche, spontan hypertensive Ratten (SHR/NHsd) (SHR) verwendet. Letztere sollen im Modell den humanen Schlaganfallrisikofaktor Bluthochdruck widerspiegeln.

Bei WU handelt es sich um albinotische Ratten, die ursprünglich im Wistar-Institute in Philadelphia (Pennsylvania, Vereinigte Staaten) aus einem Rattenstamm unbekannter Herkunft gezüchtet wurden. Im Jahre 1941 erhielt schließlich die Firma Unilever in Vlaardingen (Niederlande) einen Bestand dieser Wistar-Ratten zur eigenen Zucht, woraus sich dann die Zuchtlinie der WU etabliert hat (Datasheet „Wistar Unilever“ der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland; Stand: 13.09.2012).

Auch bei den SHR handelt es sich um albinotische Tiere. Die Zucht entstand aus einer männlichen Auszucht-Wistar-Kyoto-Ratte mit spontaner Hypertension und einem weiblichen Tier mit leicht erhöhtem, normalen Blutdruck. Zur Etablierung der

SHR-Zucht erfolgten aus der Nachzucht dieses Zuchtpaares Geschwisterverpaarungen von Nachkommen mit spontaner Hypertension (Okamoto, 1969; Datasheet „Spontaneous Hypertensive Rat“ der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland; Stand: 13.09.2012). SHR neigen normalerweise nicht zu spontanen Schlaganfällen (Okamoto et al., 1974), haben jedoch nach dem Verschluss der mittleren Zerebralarterie viel größere kortikale Infarktareale als normotensive Stämme (Duverger und Mackenzie, 1988; Coyle, 1986). Sie entwickeln ihren Bluthochdruck meist im Alter zwischen zwei und vier Monaten und erreichen mit sechs Monaten einen systolischen Blutdruck von ungefähr 200 mmHg (Howells et al., 2010).

Dass bei der vorliegenden Arbeit nur männliche Tiere zum Einsatz kommen, hängt mit der Tatsache zusammen, dass bei weiblichen Tieren der Anteil der Geschlechtshormone im Blut zyklusbedingt stark schwankt. Da weibliche Geschlechtshormone, allen voran Östradiol, erhebliches neuroprotektives Potential aufweisen (Manwani und McCullough, 2011), wären die von weiblichen Tieren gewonnenen Ergebnisse nicht mehr verlässlich reproduzier- und vor allem vergleichbar. Vor Studieneinschluss weiblicher Tiere würde deren Zyklusbestimmung oder mindestens die Bestimmung des Östradiolgehaltes im Blut nötig werden, was eine unnötige und auch vermeidbare Belastung der Tiere darstellt.

4.2 Schlaganfallmodelle bei der Ratte

Zur Herbeiführung eines Schlaganfalles bei der Ratte existiert eine Vielzahl an Modellen mit entsprechenden Vor- und Nachteilen. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen globalen und fokalen Ischämie-Modellen und zwischen endo- und exovaskulären Methoden, um die Ischämie herbeizuführen (Ginsberg und Busto, 1989; Small und Buchan, 2000; Gerriets et al., 2004c; Hossmann, 2008; Howells et al., 2010; Casals et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit kamen drei endovaskuläre Modelle zur Induktion einer fokalen Ischämie zum Einsatz:

- (1) Das sogenannte Fadenmodell nach Koizumi et al. (1986), mit dem nach Einleitung der Reperfusion der großen zerebralen Gefäße ein Modell zur Untersuchung des „No Reflow“-Phänomens und der mikrovaskulären Zirkulation zur Verfügung steht (Nedelmann et al., 2010)
- (2) Ein Thrombemboliemodell mit einer neuartigen Methode zur Herstellung der Blutgerinnsel aus thrombozytenreichem Plasma (Roessler et al., 2011a und 2011b), mit dem verlässliche Verschlüsse der großen zerebralen Gefäße (makrovaskuläre Zirkulation) gesetzt und damit sogenannte Karotis-T-Verschlüsse simuliert werden können.
- (3) Das in der Arbeitsgruppe entwickelte Gasbläschenmodell (Gerriets et al., 2010c) zur Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Gasbläschengrößen und -mengen auf die zerebrale Zirkulation.

III Material und Methoden

1. Allgemein

1.1 Versuchstiere

Die hier beschriebenen Tierversuche erfolgten nach Prüfung und Genehmigung durch die §15-Kommission des Veterinärdezernats des Regierungspräsidiums Darmstadt und wurden unter folgenden Aktenzeichen geführt:

Experimente I und II	V54-19c20/15-B2/257
Experiment III	V54-19c20/15-B2/203

Sämtliche Tiere wurden unter Einhaltung der tierschutzrechtlichen Gesichtspunkte des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313, zuletzt geändert durch Artikel 20 des Gesetzes vom 9. Dezember 2010 (BGBl. I S.1934)) ordnungsgemäß behandelt und untergebracht. Die Versuche erfolgten unter Aufsicht des Leiters des jeweiligen Tierversuchsvorhabens, Prof. Dr. Max Nedelmann (Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Gießen) (Experimente I und II) und Prof. Dr. Tibo Gerriets (Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Gießen) (Experiment III) sowie der Tierschutzbeauftragten und Tierstalleiterin Dr. Nouha Ritschel (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim). Weiterhin wurden die Leitsätze der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) eingehalten.

Für die Experimente I und III des Versuchsvorhabens wurden männliche Wistar-Unilever-Ratten (HsdCpb:WU) (WU) mit einem Gewicht zwischen 275 und 350 g im Alter zwischen 8 und 10 Wochen von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Tiere saßen zur Akklimatisierung für mindestens eine Woche im Tierstall des Max-Planck-Institutes für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim.

Für das Versuchsvorhaben Experiment II wurden ebenfalls von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) männliche, spontan hypertensive Ratten (SHR/NHsd) (SHR) mit einem Alter von 12 Wochen bezogen. Diese Tiere saßen noch für mindestens drei weitere Wochen im Tierstall, ehe sie mit einem Mindestalter von 15 Wochen (ältestes Tier: 21 Wochen) und einem durchschnittlichen Gewicht von 290 bis 375 g im Versuchsvorhaben eingesetzt wurden.

Alle Tiere waren vor den Versuchen in Gruppen zu je fünf Tieren in Makrolon-Käfigen vom Typ IV untergebracht und erhielten Wasser und Futter (Altromin® Haltungsdiät Ratten/Mäuse, spezial behandelt, Alleinfuttermittel für Versuchstiere; Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) ad libitum. Sie hatten als Einstreu Lignocel® Hygienic Animal bedding (Wechsel je nach Verschmutzungsgrad 1- bis 2-mal wöchentlich; J. Rettenmayer und Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland) und erhielten als Beschäftigungsmaterial Zellstofftücher und Röhren aus Pappe. Mittels Zeitautomatik erfolgte der Wechsel der Hell-Dunkel-Phase mit einer täglichen Hell-Phase von 7 bis 18 Uhr. Die Temperatur im Tierstall war auf 20 bis 22°C eingestellt, die Luftfeuchte betrug 55 bis 60%.

1.2 Analgesie und Narkose

Alle Tiere erhielten zur Analgesie 30 Minuten vor Beginn der Operation das nichtsteroidale Antiphlogistikum Carprofen (Rimadyl® Injektionslösung für Hunde und Katzen; Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht subkutan (s.c.) verabreicht.

Sämtliche Operationen sowie die Untersuchungen mit dem MRT in Experiment III erfolgten in Isofluran-Vollnarkose (Forene®; Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) bei erhaltener Spontanatmung. Die Inhalationsnarkose wurde im gläsernen Exsikkator (Duran® Exsikkator; Duran Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland) mit 5 Vol.-% Isofluran (Isofluranverdampfer: Sigma Elite Vaporizer; Penlon Ltd, Abingdon, England) in 3 l/min Druckluft eingeleitet. Nach Eintritt der Bewusstlosigkeit wurde die Ratte auf die selbstgebaute, wasserbeheizte Operationsplatte gelegt und die Narkose mittels Kopfmaske für die Zeit der Operation und der Untersuchungen mittels MRT mit der Dosis von 2-3 Vol.-% Isofluran in 0,5 l/min Druckluft bedarfsgesteuert erhalten. Um das Austrocknen der Augen der

Tiere zu verhindern, wurde Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) in den Bindehautsack eingebracht und mittels sanftem manuellen Schluss des betreffenden Augenlides im Auge verteilt.

Die Tiere aus den Experimenten I und II verblieben für die gesamte Dauer des Experimentes bis zur Tötung in Vollnarkose.

1.3 Intraoperative Überwachung

1.3.1 Innere Körpertemperatur und Atmung

Mittels rektaler Temperatursonde (Exacon® Temperatursonde Typ D-RA4; Siemens Sector Healthcare (Teil der Siemens AG), Erlangen, Deutschland) und der wasserbeheizten Operationsplatte wurde die innere Körpertemperatur der Tiere für die gesamte Dauer der Vollnarkose auf konstanten 37,0°C gehalten.

Die Spontanatmung wurde nichtinvasiv überwacht und die Narkosetiefe entsprechend gesteuert.

1.3.2 Blutdruck und Blutproben

Zur Entnahme von arteriellem Blut für die Blutgasanalyse und zur Bestimmung des mittleren arteriellen Blutdrucks wurde bei den Tieren aus Experiment III ein Polyethylen-50-Katheter (BD Intramedic® Polyethylenkatheter, Außendurchmesser (o.d.): 0,965 mm, Innendurchmesser (i.d.): 0,53 mm; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten) in die A. coccygea eingeführt. Dazu wurde das Operationsfeld kurz distal des Schwanzansatzes mit handelsüblichem Desinfektionsmittel (Kodan® Tinktur forte; Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) aseptisch für den Eingriff vorbereitet. Es erfolgte median der Hautschnitt über 1,0 bis 1,5 cm Länge und das Einschneiden der Membran über der A. coccygea in Längsrichtung mittels Mikroschere. Nach Skelettierung der Arterie mit zwei Mikropinzetten wurde das Gefäß distal permanent und proximal transient ligiert (Ethicon® 4-0 Perma-Hand-Seide® EH6722E, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Nach Durchführung der Arteriotomie wurde der mit isotoner Kochsalzlösung (0,9% Braun Ecoflac® plus; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gefüllte Katheter in die A. coccygea eingeführt und nach

dem Öffnen der proximalen Ligatur ungefähr 2 bis 3 cm in das Gefäß vorgeschoben. Anschließend wurde der Katheter mittels einer weiterer Ligatur um das Gefäß und mittels Pflaster (Leukosilk® S; BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) am Schwanz fixiert.

Mit Hilfe dieses Katheters konnte so durchgehend der mittlere arterielle Blutdruck des betreffenden Tieres überwacht werden. Dieser wurde mittels eines Druckwandlers auf einen Monitor zur Kreislaufüberwachung übertragen (Servomed; PPG Hellige GmbH, Freiburg im Breisgau, Deutschland) und auf dem Operationsprotokoll notiert.

Über den Schwanzarterienkatheter konnten außerdem die für die Blutgasanalyse benötigten Blutproben mit einer heparinisierten Kapillare (Clinitubes 100 µl; Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Dänemark) entnommen werden.

Nach Abschluss der Messungen wurde der Katheter mit 0,25 ml isotoner Kochsalzlösung gespült und anschließend entfernt. Die A. coccygea wurde permanent ligiert und die Hautwunde mit Einzelheften (Ethicon® 0 Perma-Hand-Seide® 680H; Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen.

1.3.3 Blutgasanalyse

Die arterielle Blutprobe wurde zur Analyse in das ABL 510-Blutgasanalysegerät (Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Dänemark) überführt. Die Bestimmung mit dem Gerät lieferte folgende, temperaturkorrigierte Blutwerte: pH-Wert (pH), Sauerstoff- (pO_2) und Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2), Sauerstoffsättigung (sO_2), totales Hämoglobin (tHb), Bikarbonat (HCO_3) und Basenabweichung (BE, engl. base excess).

1.4 Laser-Doppler-Messungen des zerebralen Blutflusses

Die Tiere aus den Experimenten I und II wurden in Bauchlage auf die Operationsplatte gelegt und in einen stereotaktischen Rahmen mit Non-Rupture Ear Bars (Elliptic Lab Standard™ Stereotaxic Instrument; Stoelting Co., Wood Dale, Illinois, Vereinigte Staaten) gespannt.

Nach Schur der Kopfhaut (Remington Body Hair Trimmer, Model BHT2000 Bodyguard; Remington Deutschland, Ellwangen, Deutschland) erfolgte die aseptische Vorbereitung des Operationsfeldes (Kodan® Tinktur forte; Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland). Anschließend wurde die Kopfhaut medial über eine Länge von ungefähr 2 cm inzisiert. Am kaudalen Ende dieses ersten Schnittes wurde im rechten Winkel mittig dazu ein weiterer, ungefähr 1 cm langer Schnitt angebracht und anschließend die Hautlappen jeweils nach lateral weggeklappt. Das nun freiliegende Gewebe wurde mit 2% Lidocain (Xylocain® 2% Injektionslösung; AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) behandelt. Ungefähr 3 min nach Applikation der lokalen Anästhesie erfolgte dann die Freipräparation des Schädelknochens.

Zur validen Messung des regionalen zerebralen Blutflusses (rCBF, engl. regional Cerebral Blood Flow) im Versorgungsgebiet der mittleren Zerebralarterie (A. cerebri media, ACM) mittels Laser-Doppler-Sonde (OxyFlo XP Probe; Oxford Optronix Ltd, Oxford, England) musste der Schädelknochen rechts der Sutura sagittalis zwischen Sutura coronalis und Sutura lambdoidea auf einer Fläche von 5 x 10 mm mittels Diamantbohrkopf (Dremel® 300; Dremel Deutschland, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland) dünn gefräst werden.

Der Schädelknochen stellte sich anschließend durchscheinend und elastisch, jedoch noch nicht durchgebrochen dar (Ausschlusskriterium aus der Studie). Anschließend wurde mittels Nadelsonde des Laser-Doppler-Gerätes (OxyFlo 2000®: Microvascular Perfusion Monitor; Oxford Optronix Ltd, Oxford, England) auf dieser Knochenlamelle mäanderförmig an fünfzehn beliebigen Punkten die Messung des rCBF (Einheit: bpu, engl. blood perfusion unit) vorgenommen (Söhle et al., 2001) (Abb. 3-1).

Diese Messungen erfolgten an vier Zeitpunkten: erstens vor (Baseline) und zweitens nach der Okklusion der ACM, drittens nach der Reperfusion und vor Beginn der Sonothrombolyse sowie viertens nach Abschluss der sonothrombolytischen Therapie (siehe auch Abb. 3-17 Studienablauf Experiment I in Kapitel 2.1.2 und Abb. 3-19 Studienablauf Experiment II in Kapitel 2.2.2). Zwischen den Messungen wurde auf die Kopfwunde ein mit isotoner Kochsalzlösung getränkter Gazetupfer (Medicomp® Vliesstoffkompressen; Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) aufgelegt.

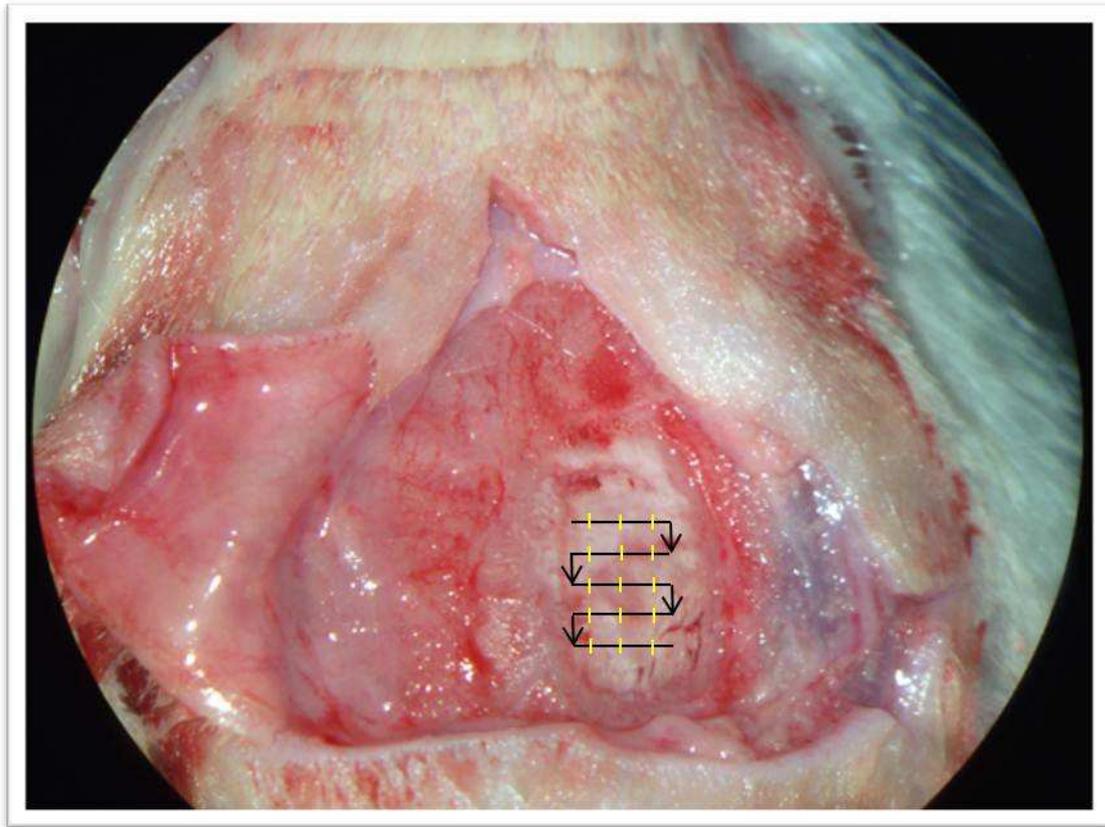


Abb. 3-1: Mäanderförmige rCBF-Messung an fünfzehn Punkten auf der Knochenlamelle

1.5 Operationstechniken

1.5.1 Das Fadenmodell

1.5.1.1 Fadenherstellung

Die Fäden – auch Okkluder genannt – wurden in leicht modifizierter Weise nach Takano et al. (1997) selbst hergestellt. Dazu wurden Nylon-Fäden (Ethicon® 4-0 Ethilon®II blau (H7143H); Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) in ungefähr 3,5 cm lange Stücke geschnitten und an einem Ende mit einem LötKolben unter mikroskopischer Sichtkontrolle mit etwas breiteren und abgerundeten Köpfchen versehen. Um eine gleichmäßig dicke Beschichtung mit Silikon zu gewährleisten, wurden die Fadenstücke auf kleine Papierstückchen aufgefädelt, in die vorher mittig mit einer 26G-Kanüle (Sterican® 26G x ½“ (braun); B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) ein Loch gestochen worden war. Das Zweikomponenten-Silikon (Provil® novo, Light Base & Light Catalyst; Heraeus

Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) wurde nach Anleitung angemischt und die Fadenstücke wurden zunächst durch das Silikon und anschließend zum Abstreifen überschüssigen Silikons durch das Loch im Papierstückchen gezogen. Zum Abschluss wurden die so beschichteten Fäden zum Trocknen kopfüber aufgehängt und nach 24 h auf eine Länge von 3 cm zugeschnitten.

1.5.1.2 *Induktion der Ischämie*

Bei den Tieren aus Experiment I wurde die zerebrale Ischämie mit dem Fadenmodell nach Koizumi et al. (1986) erreicht. Diese Methode fand bereits in einem vorherigen Experiment zur Testung der Wirksamkeit eines der auch hier getesteten Ultraschallkontrastverstärker ihre Anwendung und hat sich dort als Modell des „No Reflow“-Phänomens erwiesen (Nedelmann et al., 2010).

Die Tiere wurden in Rückenlage auf der beheizten Operationsplatte positioniert. Nach Schur und Desinfektion des ventralen Halsbereiches zwischen Manubrium sterni und den Anguli mandibularum erfolgte medial der ungefähr 2 cm lange Sagittalschnitt (Abb. 3-2).

Nach stumpfer Trennung der linken und rechten Speicheldrüsenpakete (Glandula (Gl.) mandibularis und Gl. sublingualis) wurden die rechten dieser Drüsen zusammen mit dem ebenfalls stumpf präparierten rechten Musculus (M.) sternomastoideus mit Hilfe zweier selbstgebauten Retraktoren nach lateral fixiert. Mit Hilfe eines weiteren Retraktors wurde der über der Trachea liegende M. sternohyoideus leicht nach medial gezogen. Kranial wurde nun der M. digastricus sichtbar – deutlich erkennbar an seinem weiß-bläulich glänzenden Sehnenstreifen. In der Mitte des durch die drei genannten Muskeln gebildeten Dreiecks kam die noch von Bindegewebe, Nerven- und kleineren Gefäßgeflechten umgebene, rechte Karotisbifurkation zum Vorschein (Abb. 3-3).

Unter Schonung des der A. carotis communis (ACC) und A. carotis interna (ACI) lateral direkt anliegenden Nervus (N.) vagus wurde die Bifurkation unter dem Operationsmikroskop (OPMI® pico S100; Carl Zeiss Meditec Vertriebsgesellschaft mbH, Oberkochen, Deutschland) vorsichtig skelettiert (Abb. 3-4).



Abb. 3-2: Schnitt am ventralen Halsbereich der Ratte mit anschließender stumpfer Trennung der Speicheldrüsen und ventralen Halsmuskeln

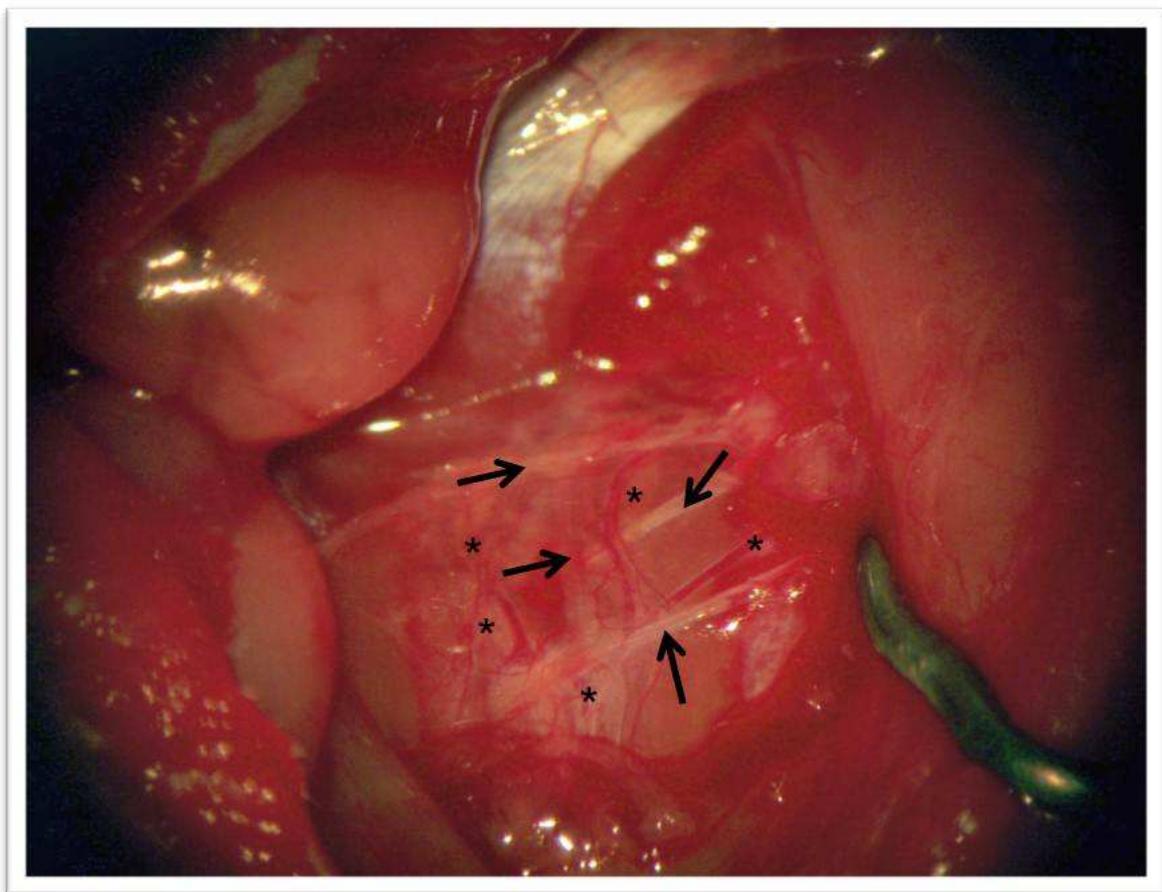


Abb. 3-3: Von Bindegewebe, Nerven (↑) und kleineren Gefäßgeflechten (*) umgebene, rechte Karotisbifurkation

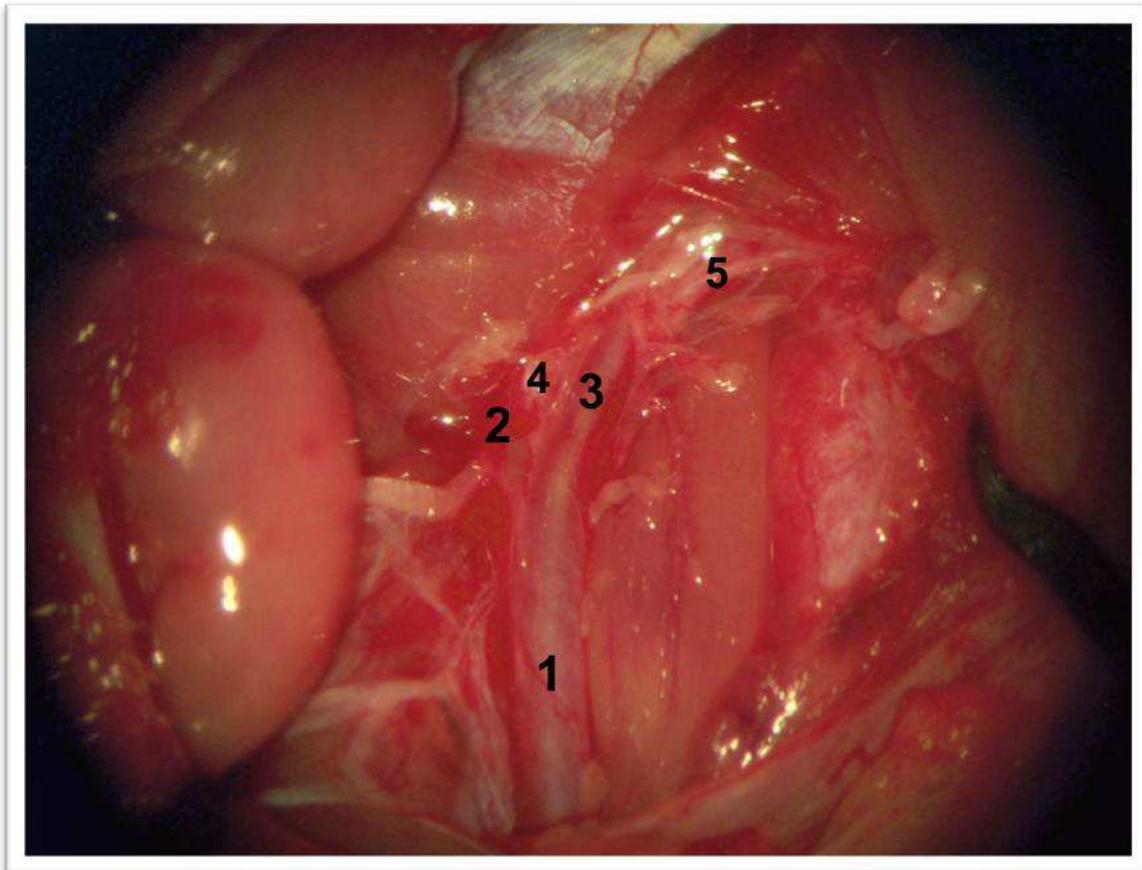


Abb. 3-4: Skelettierte rechte Karotisbifurkation mit Darstellung der Äste der A. carotis externa; (1) A. carotis communis, (2) A. carotis interna, (3) A. carotis externa, (4) A. occipitalis, (5) A. thyroidea superficialis

Anschließend erfolgten die permanente Ligatur der A. carotis externa (ACE) an ihrem Ursprung in der Bifurkation und die permanente Ligatur der distalen ACC. Nach dem transienten Verschluss der ACI mittels Schlingligatur wurde die ACC mit einer Mikroschere arteriotomiert und der Okkluder in die ACC eingeführt. Das Okkluderköpfchen wurde bis zur Schlingligatur der ACI vorgeschoben. Anschließend wurde eine weitere Ligatur um die ACC angebracht, um den sich darin befindenden Okkluder locker zu fixieren. Danach wurde die transiente Schlingligatur um die ACI geöffnet und der Okkluder darin solange vorgeschoben, bis ein leichter Widerstand spürbar war. Dieser Widerstand markierte die korrekte Endposition des Okkluderköpfchen in der Abzweigung der A. cerebri anterior/rostralis (ACA) (Abb. 3-5) und führte durch die Blockade des Ursprungs der ACM zur Ischämie in deren Versorgungsgebiet (mittlerer Zerebralarterienverschluss, engl. middle cerebral artery occlusion, MCAO).

Die Distanz zwischen Okkluderende und Karotisbifurkation wurde gemessen und musste bei Ratten dieser Größe zwischen 18 und 22 mm betragen, um die korrekte Position des Okkluderköpfchens an der Abzweigung der ACA anzuzeigen. Bei einer Distanz <18 mm konnte der vollständige Verschluss der ACM nicht mehr sicher gewährleistet werden. Bei einer Messung >22 mm bestand die Gefahr, dass das Okkluderköpfchen die Wand der ACA durchstoßen und damit eine Subarachnoidalblutung (SAB) verursacht hätte. Tiere mit inkompletten Verschlüssen der ACM (bei Distanzen <18 mm) und Tiere mit SAB (nach der Gehirnentnahme festgestellt) wurden von der Studie ausgeschlossen.

Bei korrekter Position des Okkluders erfolgte für die 90-minütige Ischämiezeit dessen feste Fixierung mittels der vorher gelegten und bisher locker geknoteten Ligatur um die ACC.

Der Hautschnitt wurde anschließend in fortlaufender Nahttechnik bis zur Reperfusion verschlossen.

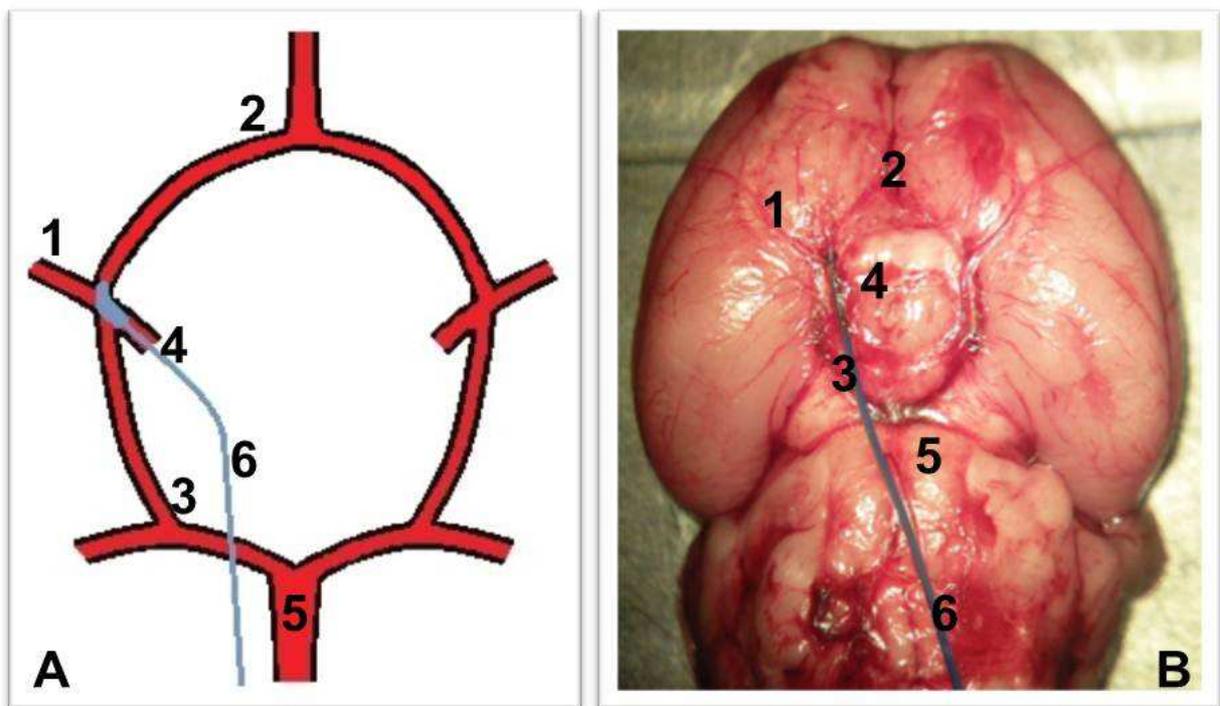


Abb. 3-5: Basale intrazerebrale Gefäßanatomie mit Blick auf den Circulus arteriosus cerebri (Willisii) der Ratte mit Okklusion der A. cerebri media durch das Fadenköpfchen, schematische Darstellung (A) und Fotografie (B); (1) A. cerebri media, (2) A. cerebri anterior/rostralis, (3) A. cerebri posterior/caudalis, (4) A. carotis interna, (5) A. basilaris, (6) Faden

1.5.1.3 *Reperfusion*

85 min nach Ischämiebeginn wurde die Hautnaht wieder eröffnet und nach Darstellung der Karotisbifurkation abermals eine temporäre Schlingligatur um die ACI gelegt. Der Knoten der den Okkluder fixierenden Ligatur um die ACC wurde gelockert. Exakt 90 min nach MCAO wurde der Okkluder vorsichtig unter gleichzeitigem Lockerlassen der Schlingligatur um die ACI herausgezogen und die ACM somit rekanalisiert. Nach Entfernung des Okkluders wurde die ehemals fixierende Ligatur abermals fest verknötet und die ACC damit permanent verschlossen. Nach der Entfernung der Schlingligatur um die ACI wurde die Hautwunde am Hals wieder in fortlaufender Nahttechnik verschlossen.

1.5.2 ***Das Thrombembolienmodell***

1.5.2.1 *Präparation der Thromben*

Bei diesem Modell kamen Thromben aus thrombozytenreichem Plasma (engl. platelet rich plasma, PRP) zum Einsatz, die in leicht modifizierter Weise nach der Methode nach Roessler et al. (2011a und b) hergestellt wurden.

Das Blut zur Präparation eines PRP-Thrombus durch kardiale Punktion einem Spendertier entnommen. Als Spendertiere dienten Tiere aus der Kontrollgruppe, die somit keine Behandlung mit rt-PA oder BR38 erhalten hatten. Das kardiale Vollblut wurde im Verhältnis von 9:1 mit dem Gerinnungshemmer Natriumcitrat (3,2%; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gemischt und anschließend für 15 min bei 4°C mit 180xG zentrifugiert (Centrifuge 5430R eppendorf; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Nach erfolgter Zentrifugation hatten sich drei Schichten gebildet: die unterste Schicht enthielt die Erythrozyten, die mittlere Schicht repräsentierte den sogenannten Buffy-Coat und darüber befand sich das Plasma. Der Buffy-Coat, hauptsächlich bestehend aus den Leukozyten und den Thrombozyten, wurde zusammen mit dem Blutplasma abpipettiert, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend für 20 min bei 4°C mit 1500xG zentrifugiert. Auch nach dieser Zentrifugation waren im Röhrchen drei Schichten sichtbar. Das obere Drittel (thrombozytenarmes Plasma) wurde abpipettiert und

verworfen, das untere Drittel enthielt die zellulären Bestandteile. Beim mittleren Drittel handelte es sich schließlich um das zur Thrombenherstellung benötigte PRP. 100 µl PRP wurden mit 24 µl Calciumchlorid (20 mM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gemischt, in einen Polyethylen-50-Katheter gezogen und dessen Enden mit zwei Arterienklemmen verschlossen. Anschließend erfolgte die Inkubation des Thrombus für 2 h bei 37°C (Innova™ 4 200; New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, Vereinigte Staaten). Nach der Inkubation wurde der PRP-Thrombus in eine mit isotoner Kochsalzlösung gefüllte Petrischale (Falcon®, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) gespült und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde vor der Operation vom Gesamthrombus ein 3 cm langes Stück abgeschnitten und für 5 min mit Evans Blau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gefärbt. Anschließend wurde dieses Thrombusstück zusammen mit isotoner Kochsalzlösung in einen Polyethylen-8-Katheter (SAI PE-8-Katheter, i.d. 0,20 mm, o.d. 0,36 mm; Strategic Applications Inc., Lake Villa, Illinois, Vereinigte Staaten) gezogen, über den es später in das Karotis-T (gebildet aus ACI, ACM und ACA) injiziert wurde.

1.5.2.2 *Induktion der Ischämie*

Die Präparation der Versuchstiere erfolgte bis zur Darstellung und Skelettierung der Karotisbifurkation analog der Operationstechnik des Fadenmodells.

Im Gegensatz zum Fadenmodell wurde nun aber ein Stumpf der ACE präpariert. Dazu erfolgte die bipolare Elektrokoagulation (Minicutter® KLS Martin; Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) der ihr abgehenden Äste (A. occipitalis und A. thyroidea superficialis). Möglichst weit distal der Karotisbifurkation wurde nun eine Ligatur um die ACE angebracht, das Gefäß distal dieser Ligatur ebenfalls bipolar koaguliert und nach kaudal verlagert (Abb. 3-6).

Vor Applikation der Thromben musste nun noch die A. pterygopalatina ligiert werden. Anschließend wurden eine Schlingligatur um die ACC und eine weitere Schlingligatur um die ACI angebracht, ehe der ACE-Stumpf arteriotomiert wurde. In den ACE-Stumpf wurde nun der PE-8 Katheter, in dem sich der vorher präparierte PRP-Thrombus in isotoner Kochsalzlösung befand, eingeführt und locker mit einer weiteren Ligatur um die ACE fixiert. Gleichzeitig mit dem Eröffnen der Schlingligatur

um die ACE wurde der Katheter in der ACI vorgeschoben bis ein leichter Widerstand spürbar war. Dieser Widerstand deutete wie auch schon im Fadenmodell darauf hin, dass die Spitze des Katheters die Abzweigung der ACA erreicht hatte. Daraufhin wurde der Katheter 1-2 mm zurückgezogen und der Thrombus zusammen mit etwa 30 µl Kochsalzlösung injiziert. Nach weiteren 10 min, mit denen sichergestellt wurde, dass der Thrombus am Endothel anhaftete, wurde der Katheter wieder entfernt und der arteriotomierte ACE-Stumpf permanent mittels bipolarer Koagulation ligiert. Die Schlingligaturen um die ACC und die ACI wurden entfernt und damit der Blutfluss in diesen Gefäßen wieder hergestellt (Abb. 3-7). Abschließend wurde die Halswunde mittels fortlaufender Nahttechnik verschlossen.

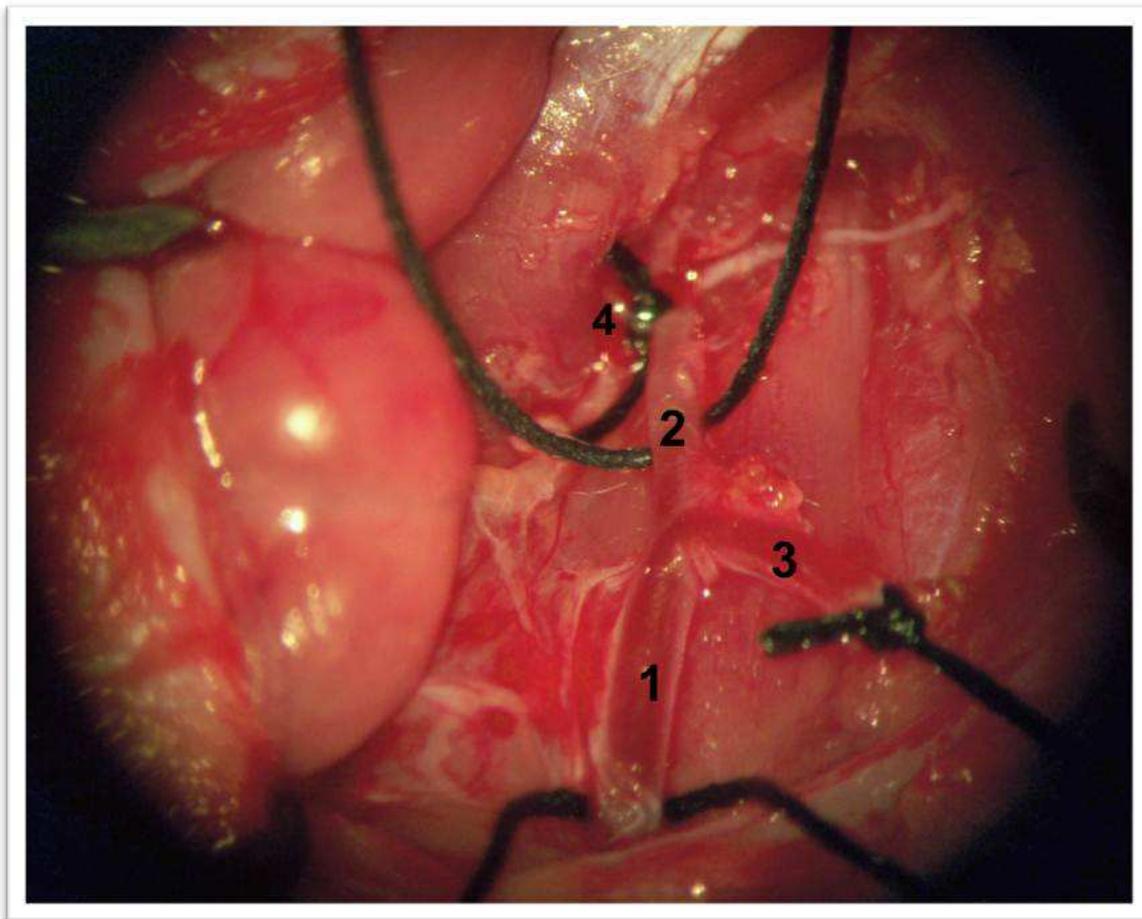


Abb. 3-6: Kaudalverlagerter Stumpf der A. carotis externa; (1) A. carotis communis, (2) A. carotis interna, (3) kaudalverlagerter Stumpf der A. carotis externa, (4) ligierte A. pterygopalatina

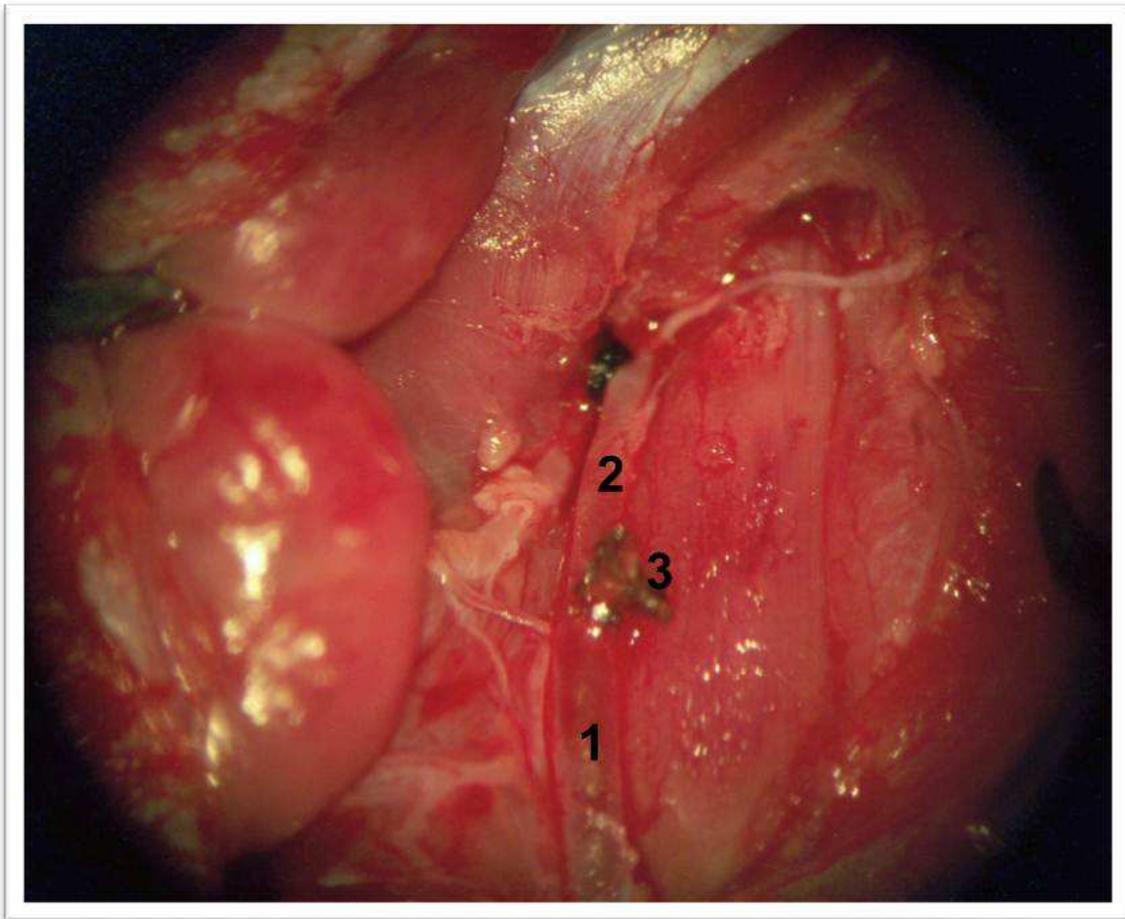


Abb. 3-7: Wiederhergestellter Blutfluss in der A. carotis communis und der A. carotis interna; die A. carotis externa ist nur noch als kleiner Stumpf sichtbar; (1) A. carotis communis, (2) A. carotis interna, (3) ligierter Stumpf der A. carotis externa

1.5.3 Das Gasbläschenmodell

1.5.3.1 Erzeugung der Gasbläschen

Zur Erzeugung der für das Experiment III benötigten Gasbläschen in definierter Größe und definierter Menge kam eine von der Arbeitsgruppe entwickelte Apparatur zum Einsatz (Gerriets et al., 2010c).

Die Apparatur bestand aus zwei ineinander liegenden Kapillaren (ringcaps® 50 + 100 µl; Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland). Die innere der beiden wurde zunächst durch Erhitzen mit einem Gasbrenner (Handlötgerät Piezo-Compact PC 140 mit Universalgas (30% Propan/70% Butan); CFH Löt- und Gasgeräte GmbH, Offenau, Deutschland) auf einen Durchmesser von 15 bis 40 µm (je nach benötigter Größe der Gasbläschen) ausgezogen. Durch diese

kleine Kapillare erfolgte der Gaszustrom mit Druckluft (automatischer Leiselaufkompressor Sil-Air®15A S230/50; Werther International S.p.A., Cadé, reggio Emilia, Italien), so dass sich an ihrer dünnggezogenen Spitze die Gasbläschen bilden konnten. Damit der Rand der Spitze gleichmäßig glatt war und es damit zu keinen Unregelmäßigkeiten bei der Gasbläschenbildung kam, wurde die Kapillare mit ihrer Spitze für 2 min in Flusssäure (HF, Fluorwasserstoffsäure; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gehalten. Damit die Spitze bei dieser Prozedur offen blieb, wurde sie über die Kapillare für diese Zeit mit Druckluft durchströmt. Nach der Reinigung mit destilliertem Wasser wurde die dünnggezogene Kapillare anschließend so innerhalb der größeren Glaskapillare (450 µm Durchmesser) positioniert, dass ihre dünne Spitze exakt an einer kegelförmigen Verengung (ebenfalls mit dem Gasbrenner hergestellt) der äußeren Kapillare zu liegen kam. Über die äußere, große Kapillare erfolgte der Flüssigkeitszustrom mit 37°C warmer, isotoner Kochsalzlösung. An der Spitze der kleinen Kapillare bildeten sich die Bläschen, die mit dem Flüssigkeitszustrom mitgerissen und in einen Teflonkatheter (PTFE-Chemieschlauch, natur, i.d. 0,5 mm, o.d. 0,78 mm; Reichelt Chemietechnik GmbH & Co. Heidelberg, Deutschland) eingespült wurden (Abb. 3-8).

Die Anzahl der Bläschen wurde über die Regulierung der zugeführten Druckluft geregelt (Präzisionsdruckregulator Manostat®R27 Watson Smith; Norgren Ltd, Leeds, England). Für dieses Versuchsvorhaben war ein Druck zwischen 0,5 und 1,5 bar nötig. Einfluss auf den benötigten Druck nahmen unter anderen auch der Durchmesser der inneren, kleinen Kapillare und der mittlere arterielle Blutdruck des Versuchstieres. Die Verjüngung in der Mitte der größeren Kapillare diente dazu, die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsstromes an dieser Stelle zu erhöhen, um so die Bläschen schneller von der dünnen Kapillarenspitze abreißen zu lassen und damit mehr Bläschen pro Zeiteinheit zu erzeugen.

Die Größe der Gasbläschen war direkt abhängig vom Durchmesser der Spitze der inneren Kapillare und von der Infusionsgeschwindigkeit der Kochsalzlösung. Letztere wurde für alle Versuchsgruppen mittels einer Infusionspumpe (Spritzenpumpe Becton Dickinson, Modell Program 1; MC Medizintechnik GmbH, Alzenau-Hörstein, Deutschland) auf eine Flussrate von 20 ml/h eingestellt. Auch die Verjüngung der äußeren Kapillare hatte über die lokale Erhöhung der Flussgeschwindigkeit in

diesem Bereich einen Einfluss auf die Bläschengröße. Zusätzlich konnte die Spitze der inneren Kapillare mittels eines elektromagnetischen Frequenzmodulators (Voltcraft® 7202 Sweep/Function Generator; Conrad Electronics SE, Hirschau, Deutschland) in Sinusschwingungen versetzt werden. Je stärker diese Schwingungen der Kapillarenspitze waren, desto schneller wurden die Bläschen vom Flüssigkeitsstrom mitgerissen und desto kleiner waren sie.

Da der mittlere arterielle Blutdruck des Versuchstieres zu Veränderungen innerhalb dieses Systems führte und damit auch die Bläschengröße und -anzahl beeinflussen konnte, wurde die Apparatur an einen Infusionsbeutel (Retransfusionsbeutel, 160 cm, 1000 ml; free life GmbH, Aachen, Deutschland) mit isotoner Kochsalzlösung angeschlossen. Der Druck innerhalb des Infusionsbeutels wurde während der Operation an den individuellen mittleren arteriellen Blutdruck des jeweiligen Versuchstieres angeglichen. Mittels einer selbstgebauten Dreiwegehahnkonstruktion konnten so die Bläschen entweder in den Druckausgleichsbeutel oder über den Teflonkatheter in das Studientier eingeleitet werden (Abb. 3-8). Dieser Teflonkatheter musste für die exakte Quantifizierung der Bläschenanzahl vor dem Einleitungsbeginn frei von Gasbläschen sein und wurde deshalb mit isotoner Kochsalzlösung gefüllt.

Zur Quantifizierung der Bläschengröße und -anzahl wurde das Kapillarensystem in ein Mikroskop (Bresser GmbH, jetzt Meade Instruments Europe GmbH & Co. KG, Rhede, Deutschland) eingelegt, über dem eine Hochgeschwindigkeitskamera (Kamera A602f-2, Basler AG, Ahrensburg, Deutschland) angebracht war. Diese Kamera lieferte Bilder an ein von der Arbeitsgruppe speziell für dieses Vorhaben entwickeltes Computerprogramm (Software auf Mac Book Pro, Mac OS x, Version 10.5.1; Apple Inc., Cupertino, Kalifornien, Vereinigte Staaten), mit dem dann die Bläschengröße und -anzahl aufgenommen und zusammen mit der benötigten Injektionszeit digital ausgewertet werden konnte.

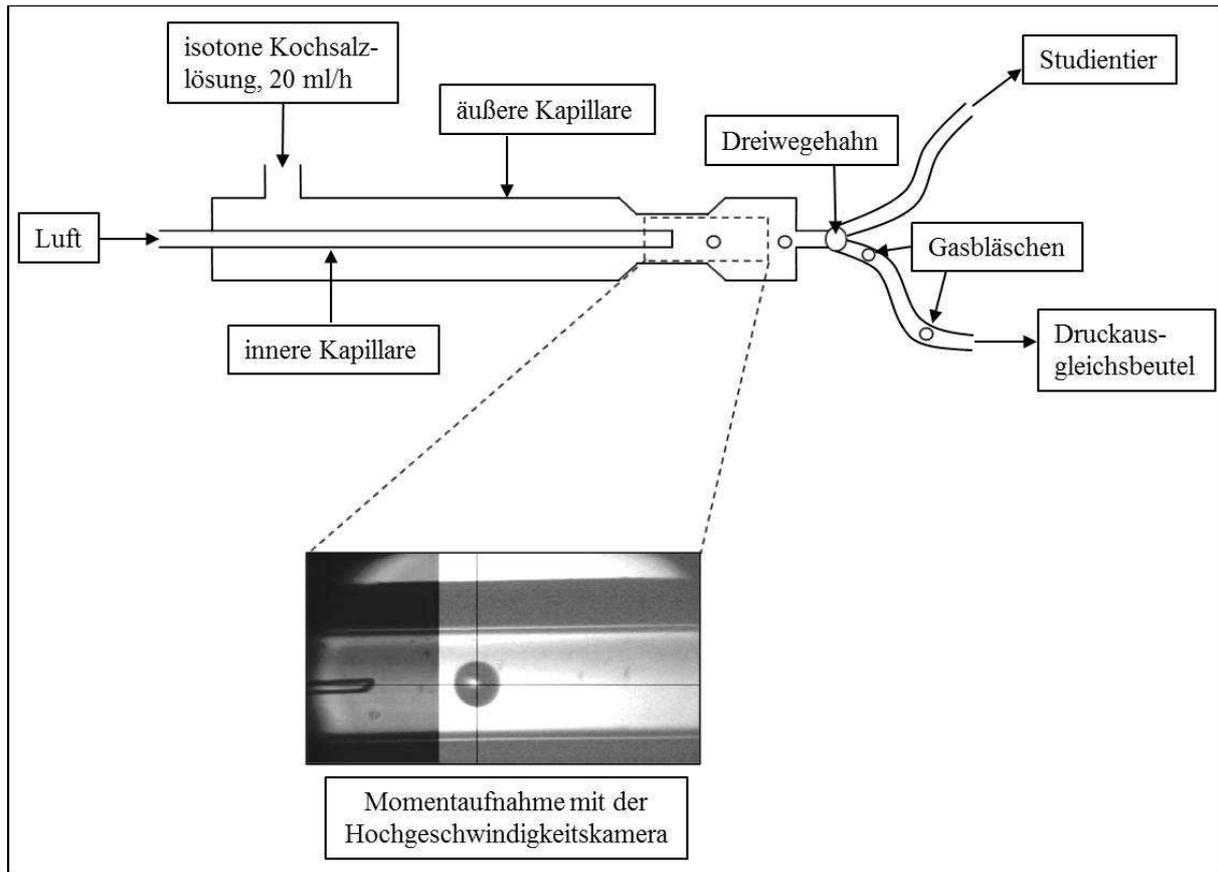


Abb. 3-8: Schematische Darstellung der Konstruktion zur Gasbläscherzeugung und des Dreiwegehahnes für die Umstellung zwischen Druckausgleichsbeutel und Studientier (modifiziert nach Gerriets et al., 2010c)

1.5.3.2 Einleitung der Gasbläschen in die zerebrale Zirkulation

Die Präparation der Versuchstiere erfolgte bis zur Arteriotomie des ACE-Stumpfes entsprechend der Operationstechnik des Thrombembolienmodells.

In den arteriotomierten ACE-Stumpf wurde nun der mit isotoner Kochsalzlösung gefüllte Teflonkatheter eingeführt und mittels vorgelegter Halteligatur so fixiert, dass seine Spitze direkt in der Karotisbifurkation zu liegen kam. Die Schlingligaturen um die ACI und die ACC wurden geöffnet und der Blutfluss vom Herzen ins Gehirn wieder hergestellt. Erst dann erfolgte die Umstellung des Dreiwegehahnes der Gasbläschenapparatur vom Druckausgleichsbeutel auf das Versuchstier. Gleichzeitig mit dem Umstellen wurde die Aufzeichnung des Gasbläschenstromes am Computer gestartet. Nach dem Erreichen der entsprechenden Gasbläschenanzahl wurde zunächst die Druckluftzufuhr unterbrochen. Erst nachdem unter mikroskopischer Kontrolle alle Gasbläschen mit dem Blutstrom fortgespült und etwa 2 min

Infusionszeit vergangen waren, wurde die Aufzeichnung am Computer gestoppt und gleichzeitig der Dreiwegehahn wieder auf den Druckausgleichsbeutel umgestellt.

Die Schlingligaturen um die ACC und die ACI wurden wieder geschlossen und der Teflonkatheter entfernt. Der ACE-Stumpf wurde permanent ligiert, die Schlingligaturen entfernt und abschließend die Hautwunde des Versuchstieres mit Einzelheften verschlossen.

Nach dem Beenden der Narkose wurden die Versuchstiere bis zum vollständigen Wiedererwachen gewärmt, ehe sie in ihren Käfig umgesetzt wurden.

Die Aufzeichnung am Computer wurde für die spätere Auswertung gespeichert. Über die gleichzeitig mitlaufende Zeitanzeige konnte so auch exakt das injizierte Volumen an isotoner Kochsalzlösung ermittelt werden.

Bei den Tieren der Sham-operierten Gruppe aus Experiment III erfolgte die Operation analog zu den Tieren der Gasbläschengruppen. Es wurden jedoch keine Gasbläschen über den Teflonkatheter eingeleitet. Stattdessen erfolgte die Injektion der Trägerlösung (körperwarme, isotone Kochsalzlösung) mit 20 ml/h über einen Zeitraum von 2 min.

1.6 Ultraschallprotokoll

1.6.1 Einstellungen des Gerätes

Das Ultraschallgerät (Sonos® 7500; Philips Ultrasound, Andover, Massachusetts, Vereinigte Staaten) (Abb. 3-9 (A)) wurde im B-Mode mit eingeschalteter Farb-Doppler-Funktion und maximaler Ausgangsleistung (ergab einen mechanischen Index (MI, mechanical index) von 1,7) eingestellt. Die Fokuszonentiefe betrug 5 cm, die Länge der Fokuszone 0,57 cm. Als Ultraschallkopf kam eine 3 MHz-transkranielle Farbduplexsonde (S3; Philips Ultrasound, Andover, Massachusetts, Vereinigte Staaten) zum Einsatz (Abb. 3-9 (B)).

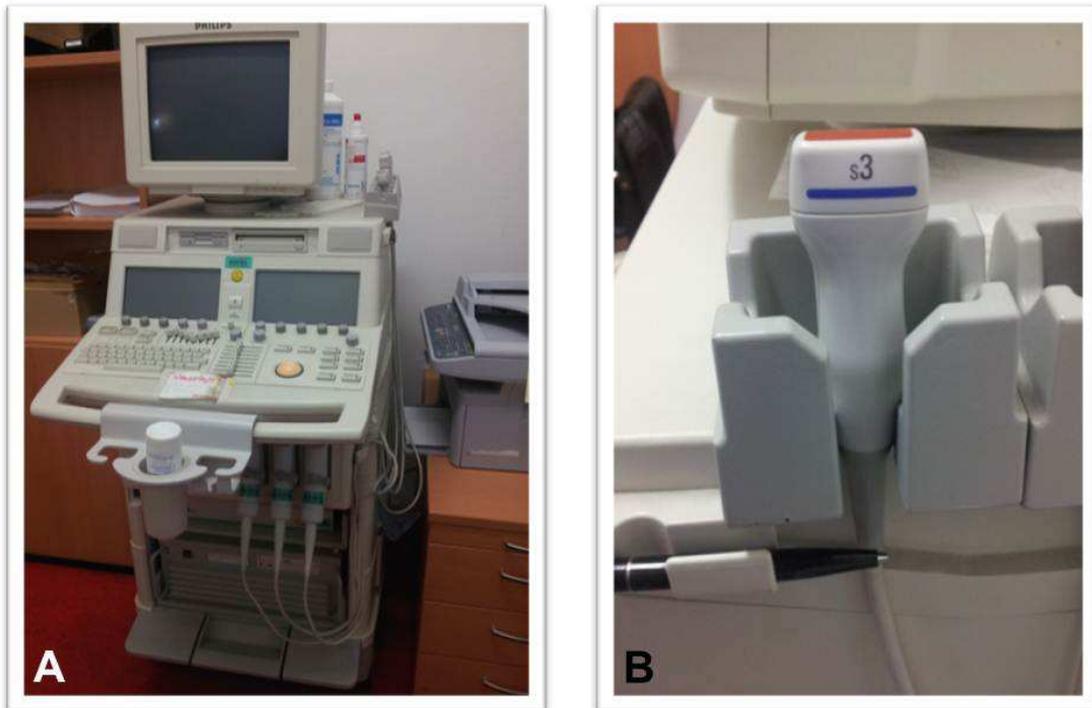


Abb. 3-9: Sonos® 7500 (A) und 3 MHz-Farbduplexsonde (B)

1.6.2 Vorbereitungen für die 60-minütige Beschallung

Die Tiere aus den Experimenten I und II wurden nach den im Anschluss an die Reperfusion (Experiment I)/90-minütigen Okklusionszeit (Experiment II) stattgefundenen Laser-Doppler-Messungen des rCBF in Bauchlage auf die Operationsplatte gelegt und die Hautlappen des Kopfes jeweils nach lateral geklappt. Die selbstgebaute Haltevorrichtung für den Sondenkopf des Ultraschallgerätes wurde mittig über dem Schädelknochen positioniert und mit Ultraschallgel (Sonosid®; Asid Bonz GmbH, Herrenberg, Deutschland) gefüllt. Anschließend wurde der 3 MHz-Schallkopf in die Haltevorrichtung gesetzt und im Abstand von 4 cm zum Schädelknochen in das Ultraschallgel eingebracht (Abb. 3-10). Dies entspricht ungefähr dem Abstand des Ultraschallkopfes zur ACM bei der transkraniellen Beschallung eines Menschen.

Bei den Tieren aus den Kontrollgruppen blieb das Ultraschallgerät aus, der Schallkopf wurde dennoch für 60 min über dem Gehirn positioniert.

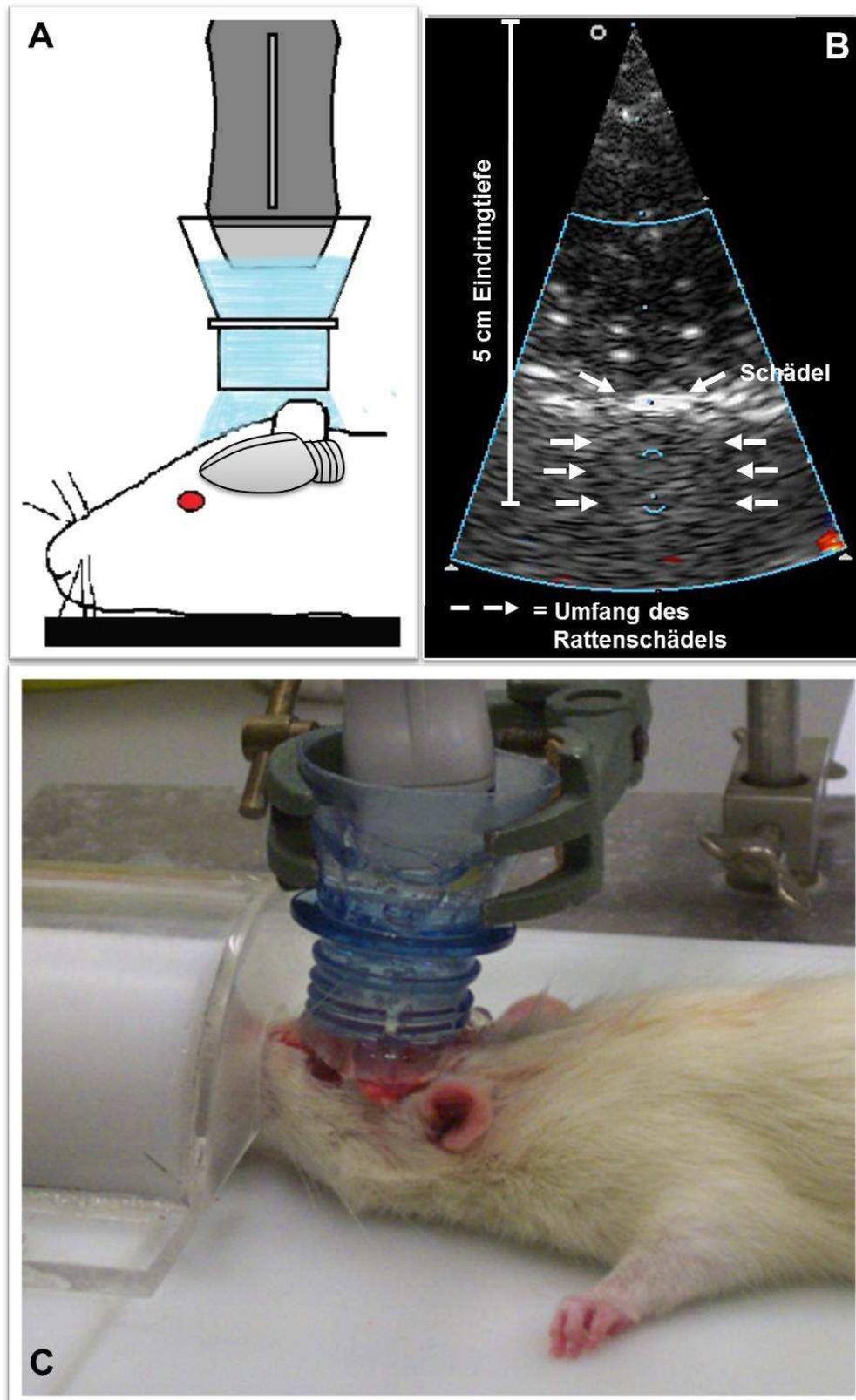


Abb. 3-10: Schematische Darstellung (A), Ultraschallbild (B; modifiziert nach Nedelmann et al., 2010) und Fotografie (C) der Behandlung mit Ultraschall

1.7 Wirkstoffapplikation

Zur Applikation der Wirkstoffe der thrombolytischen Therapie wurde den Tieren aus den Experimenten I und II ein peripherer Venenverweilkatheter (Vasofix® Safety 24G; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die V. coccygea lateralis gelegt.

1.7.1 *rt-PA*

Als Fibrinolytikum wurde das Präparat Actilyse® (Wirkstoff: Alteplase, rt-PA; Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim, Deutschland) in einer Gesamtdosis von 10 mg/kg Körpergewicht verwendet. Das Pulver wurde mit isotoner Kochsalzlösung angemischt und während der 60-minütigen Ultraschallbehandlung über den Venenverweilkatheter in die Schwanzvene der Versuchstiere injiziert. Das applizierte Gesamtvolumen betrug dabei bei jedem Tier 2,4 ml und wurde auf 12 Applikationen verteilt, das heißt es erfolgte alle 5 min eine Injektion von 0,2 ml. In den Kontrollgruppen wurde jeweils die entsprechende Menge an isotoner Kochsalzlösung appliziert.

1.7.2 *Echosignalverstärker*

Als Echosignalverstärker kamen die Mikrobläschenpräparate BR1 (SonoVue®; Schwefelhexafluoridbläschen (SF₆) mit Phospholipidhülle, negativ geladen) und BR38 (Bläschen aus 35% Perfluorbutan (C₄F₁₀) und 65% Stickstoff (N₂) mit Phospholipidhülle, ionenneutral) der Firma Bracco Research S.A. (Plan-les-Ouates, Genf, Schweiz) zum Einsatz. Ein Vergleich der Eigenschaften der beiden Mikrobläschenpräparate findet sich in Tab. 3-1.

SonoVue® ist in Deutschland für den Einsatz in der Neurosonografie zugelassen (Droste, 2008) und wurde bereits in klinischen Studien zur Verstärkung der therapeutischen Sonothrombolyse verwendet (Larrue et al., 2007; Perren et al., 2008). In tierexperimentellen Studien der Arbeitsgruppe konnte SonoVue® in der auch für die vorliegenden Experimente verwendeten Dosierung die nach ischämischen Schlaganfall beeinträchtigte zerebrale Mikrozirkulation vollständig wiederherstellen (Nedelmann et al., 2010).

Für das neue Mikrobläschenpräparat BR38 sind die Toxizitätsstudien an Ratten und Hunden sowie eine klinische Phase I-Studie an Freiwilligen (Verstärkung des diagnostischen Ultraschalls) abgeschlossen. Unerwünschte Wirkungen konnten nicht festgestellt werden. BR38 ist stabiler und langlebiger als SonoVue® und zeigt auch bei höheren Ultraschallfrequenzen (bis zu 12 MHz) eine sehr gute Wirksamkeit (Schneider et al., 2011). Petit und Mitarbeiter konnten im Jahr 2012 in einer *in vitro*-Studie an menschlichen Thromben die Sonothrombolyse-verstärkenden Eigenschaften von BR38 bei unterschiedlichen Ultraschallfrequenzen nachweisen.

	BR1 (SonoVue®)	BR38
Gas	100% Schwefelhexafluorid (SF ₆)	35% Perfluorbutan (C ₄ F ₁₀) 65% Stickstoff (N ₂)
Hülle	Phospholipid	
Ladung	negativ	neutral
Durchmesser der Bläschen	2,5 µm (0,7 – 10,0 µm)	1,4 µm (<1,0 – 6,0 µm)
Suspension mit 0,9% NaCl	5 ml	2,5 ml
Anzahl der Bläschen pro ml	4 x 10 ⁸	
Volle Dosis	10 µl der Resuspension zusammen mit 90 µl 0,9% NaCl i.v.	
Dritteldosis	33,3 µl der vollen Dosis mit 66,7 µl 0,9% NaCl i.v.	

Tab. 3-1: Eigenschaften der Mikrobläschenpräparate BR1 und BR38

Um bei beiden Präparaten die gleiche Mikrobläschenkonzentration pro ml (4×10^8) zu erreichen, wurden die lyophilisierten Pulver mit 5,0 (BR1)/2,5 ml (BR38) isotoner Kochsalzlösung gemischt (Tab. 3-1) und anschließend durch sanftes Schwenken in die milchig-weiße Suspension gebracht. Anschließend wurden für die Gruppen mit voller Dosis 10 µl des jeweiligen Präparates abpipettiert und mit isotoner Kochsalzlösung auf ein Gesamtvolumen von 0,1 ml aufgefüllt (Tab. 3-1). Diese Dosis wurde über den Schwanzvenenkatheter viermal im Abstand von 15 min während der 60-minütigen Ultraschalltherapie appliziert. Das gesamtapplizierte Volumen betrug also 0,4 ml pro Tier. Die Gesamtdosis bei der Ratte (= volle Dosis) wurde über die beim Menschen applizierte BR1-Dosis, bezogen auf das Gesamtblutvolumen berechnet (Nedelman et al., 2010).

Für die Gruppen mit Dritteldosis wurden von dem 0,1 ml Gesamtvolumen der vollen Dosis 33,3 µl abpipettiert und mit 66,7 µl isotoner Kochsalzlösung wieder auf ein Gesamtvolumen von 0,1 ml gebracht (Tab. 3-1). Auch hier erfolgte die Applikation über die 60-minütige Ultraschallbehandlung viermal im Abstand von 15 min. Das applizierte Gesamtvolumen betrug demnach auch 0,4 ml pro Tier.

Die Tiere aus den Kontrollgruppen bekamen entsprechend ebenfalls während der „Ultraschalltherapie“ viermal im Abstand von 15 min jeweils 0,1 ml isotone Kochsalzlösung über den Schwanzvenenkatheter injiziert (siehe auch Abb. 3-18 Zeitlicher Ablauf der 60-minütigen Therapie in Kapitel 2.1.4).

1.8 Klinisch-neurologische Untersuchungen

Alle Tiere wurden vor Beginn der Experimente gewogen (Soehnle, Typ: Flip; Leifheit AG, Nassau, Deutschland). Bei den Tieren aus Experiment III wurde diese Untersuchung zusammen mit der Feststellung der inneren Körpertemperatur (Digital-Fieber-Thermometer „aniEXPRESS“; Schreiber GmbH, Kreuzwertheim, Deutschland) 4 h und 24 h nach der Operation wiederholt. Außerdem wurden die Tiere aus Experiment III weiterhin vor (Baseline) sowie 4 h und 24 h nach der Einleitung der Gasbläschen neurologisch untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten nach einem neunteiligen Neuroscore (Nedelmann et al., 2007), um das Koordinationsvermögen, die Motorik und die Sensorik der Tiere zu überprüfen. Die Punkteverteilung im Neuroscore reicht von 0 bis 90 Punkten. 0 Punkte bedeuten keine neurologische Beeinträchtigung. Die Untersuchungen finden für einen Seitenvergleich der Reaktionen auf beiden Körperseiten statt. Die beinhalteten Elemente und eine Kurzzusammenfassung ihrer Durchführung und Verteilung der Punkte finden sich in Tab. 3-2. Nach erfolgter Feststellung des Neuroscores wurden die Tiere auf ein Laufrad (Eigenbau) gesetzt, um den Rotarod-Test durchzuführen (Hamm et al., 1994). Die Laufgeschwindigkeit wurde dabei von 0 rpm (Runden pro Minute) auf 30 rpm erhöht. Als Zwischenstufen wurden 6, 12, 18 und 24 rpm gewählt. Jede Stufe musste von den Tieren für 30 Sekunden gehalten werden, ehe die Geschwindigkeit auf die nächste Stufe erhöht wurde. Die zuletzt erreichte Geschwindigkeit wurde dann im Protokoll notiert. Auch diese Untersuchung erfolgte bei den Tieren aus Experiment III zu den Zeitpunkten vor (Baseline) sowie 4 h und 24 h nach der Gasbläscheninjektion.

Element	Durchführung	Normalbefund (Punkte)	Pathologische Symptome (Punkte)
Contralateral forelimb flexion	Die Ratte wird an der Schwanzwurzel angehoben	Extension beider Vordergliedmaßen (0)	Flexion der zum Infarkt kontralateralen Vordergliedmaße (10)
Instability to lateral push	Mit den Seiten des Zeigefingers des Untersuchers wird abwechselnd leichter Druck auf die Flanken des Tieres ausgeübt	„Dagegenlehnen“, Ausgleichen des ausgeübten Drucks durch Gegendruck (0)	Das Tier lässt sich zur Seite wegdrücken oder fällt zur Seite (10)
Tail hanging	Die Ratte wird mindestens dreimal hintereinander an der Schwanzwurzel angehoben	Das Tier hängt zunächst locker mit dem Kopf nach unten und zeigt mit zunehmender Dauer des „Hängens“ exploratives Verhalten durch Hochwinden auf beide Seiten (0)	Das Tier windet sich dreimal in Folge zu der dem Infarkt kontralateralen Seite hoch und verharrt in dieser Position (10)
Walking on ground	Das Tier wird auf eine reizfreie Fläche gesetzt und darf sich dort frei bewegen	Explorative, spontane Bewegungen in alle Richtungen oder ungerichtete Fluchtreaktion (0)	Abnormale Bewegungen, die Ratte driftet in eine Richtung, kann sich nur noch kreisförmig fortbewegen (5) oder ist nicht mehr fähig zu laufen (10)
Whisker movements	Beobachtung der Tastaarbewegungen	Tastaare auf beiden Seiten voll beweglich (0)	Tastaare auf der zum Infarkt kontralateralen Seite nicht beweglich (10)
Consciousness	Beurteilung des Bewusstseins und Reaktion auf äußere Reize (Manipulationen, Umgebungsreize, akustische Stimuli)	Exploratives oder Fluchtverhalten (0)	Tier reagiert auf keine Reize oder ist bewusstlos (10)
Hearing	Händeklatschen außerhalb des Gesichtsfeldes der Ratte	Reaktionen auf das Klatschen, von Bewegungen der Ohren bis hin zum Zusammenzucken (0)	Fehlende Reaktion auf das plötzliche Geräusch (10)
Sensory	Berührungen oder leichtes Ziehen an den Haarspitzen des Felles in den Flanken beidseits	Reaktion auf die taktilen Reize (0)	Keine Reaktion (10)
Vision: Hemianopia	Beidseitige Durchführung des Drohreflexes	Positiv (0)	Negativ (10)

Tab. 3-2: Kurzbeschreibung der Elemente des Neuroscores

1.9 Magnetresonanztomografie

Zur nichtinvasiven Darstellung und Untersuchung von ischämischen Hirnarealen und Ödembildung im Gehirn nach Einleitung von Gasbläschen in die zerebrale Zirkulation wurden die Gehirne der Versuchstiere aus Experiment III 24 h nach der Operation mit einem tierexperimentellen 7.0 Tesla-Kernspintomografen (Magnetresonanztomograf, MRT; Bruker PharmaScan 70/16 (elektromagnetische Feldstärke 7,0 T, Durchmesser der Öffnung 16 cm); Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) gescannt (Beauchamp et al., 1999; Benveniste et al., 1992).

Die Larmorfrequenz beträgt für das genutzte Gerät 300,51 MHz und lässt sich aus dem Drehimpuls des für Kernspinuntersuchungen genutzten Wasserstoffisotops ^1H und der Stärke des Elektromagneten des MRT berechnen.

Der MRT ist außerdem mit einem nach allen Seiten abgeschirmten Gradientensystem von 300 mT/m ausgestattet, womit eine dreidimensionale Lokalisation möglich wird. Weitere Spulen dienen zum Ausgleich von Störungen des Magnetfeldes aus dem Umfeld (Shim-System).

1.9.1 Positionierung der Tiere

Die Fixierung der Versuchstiere im linearpolarisierenden Volumenresonator (Durchmesser: 60 mm) erfolgte nach Eintreten der Narkose in einer speziellen Halterung. Das Tier wurde hierzu in Bauchlage mit den oberen Schneidezähnen in die Narkosemaske gezogen. Um Bewegungsartefakte durch die Atmung zu vermeiden, wurde nun der Kopf des Tieres zusammen mit der Narkosemaske in einen konusförmigen Kunststoffhalter gezogen und anschließend die gesamte Konstruktion in der Röhre des MRT platziert. Durch eine unter dem Brustkorb des Tieres angebrachten Atemsonde konnte nichtinvasiv die Atemfrequenz überwacht werden. Diese lag für die Zeit der Messungen stets zwischen 50 und 70 Zügen pro Minute und wurde anhand der Isofluran-Narkosegaskonzentration gesteuert. Weiterhin wurde die Körpertemperatur der Tiere mittels einer mit einer rektalen Temperatursonde rückgekoppelten, warmwasserdurchströmten Kunststoffröhre konstant auf 37°C gehalten.

1.9.2 Bildgebung

1.9.2.1 Positionierung des Volumenresonators

Um die Tiere im Resonator für die nachfolgenden Messungen exakt in der Röhre des MRT zu positionieren, wurde nach dem erfolgten manuellen Tuning und Matching zunächst eine Spinecho-Sequenz mit einer Repetitionszeit (TR) von 150 ms, einer Echozeit (TE) von 12 ms und einer Schichtdicke von 4 mm durchgeführt.

Die Positionsbestimmung erfolgte im Anschluss anhand der gewonnenen Bilder, die in drei Ebenen (axial, sagittal und koronal) angesehen und bewertet werden konnten. Nach der ersten Beurteilung konnte so der Volumenresonator zur korrekten Positionierung des Tieres noch verschoben und gedreht werden.

1.9.2.2 Feinjustierung der Positionierung

Da die spätere Bestimmung der Mittellinienverlagerung und des Läsionsvolumens im koronaren Schnittbild erfolgte und hier keinerlei Abweichungen tolerabel waren, musste die Positionierung der für diese Auswertung durchgeführten Scans so exakt wie möglich durchgeführt werden. Es wurden mehrere schnelle (TR = 2500 ms, TE = 41,8 ms), T2-gewichtete, sogenannte RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement)-Messungen mit geringer Schichtdicke (1 mm) ausgeführt. Nach der ersten Messung erfolgte die Winkelkorrektur der koronaren Schnitte, die mit einer weiteren RARE-Sequenz überprüft wurde. Dieses Vorgehen wurde so lange wiederholt, bis die exakte Positionierung erreicht war.

1.9.2.3 Diffusionsgewichtete Bildgebung

Für die Quantifizierung des zytotoxischen, intrazellulären Ödems, das in der Akutphase des Hirninfarktes in Folge des Zusammenbruchs der Adenosintriphosphat (ATP)-Pumpe entsteht, musste der Diffusionskoeffizient des Wassers (apparenter Diffusionskoeffizient, ADC, engl. apparent diffusion coefficient) erfasst werden (Gerriets et al., 2004b; Benveniste et al., 1992; Busza et al. 1992;). Es erfolgte die Anfertigung diffusionsgewichteter Bilder (DWI, engl. diffusion-weighted imaging) mit einer fettunterdrückenden EPI (Echo Planar Imaging)-Sequenz.

Um die Bildqualität dieser Bilder zu verbessern, wurde vorher noch eine Volumen-Shim-Sequenz (volumenselektive Doppel-Spinecho-Spektroskopie-Sequenz, TR = 1 s, TE = 30 ms, Voxelgröße 10 x 8 x 15 mm³) durchgeführt. Die mit der Doppel-Spinecho-Sequenz aufgenommene Halbwertsbreite des Wassersignals erreichte danach zwischen 25 und 35 Hz.

Im Anschluss erfolgte die diffusionsgewichtete Bildgebung (6 Schichten mit 2 mm Schichtdicke, Field of View (FOV) 32 x 32 mm, Matrixgröße 128 x 128, TR = 3003 ms, TE = 38,6 ms, number of excitations = 4). Zur quantitativen Erfassung des ADC wurden die Messungen mit fünf unterschiedlichen Diffusionsgradienten (10, 40, 70, 100 und 130 mT/m) wiederholt (Diffusionsgradientendauer = 9 ms, Gradientenseparationsdauer = 15 ms).

Die Auswertung des ADC erfolgte dann mittels der Software Paravision 5.1 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland). Auf den Schichten mit Hirninfarkt wurden im kortikalen und subkortikalen Zentrum der Läsion Regions of Interest (ROI) bestimmt. Diese ROI wurden ebenfalls auf der entsprechenden Position in der kontralateralen Hemisphäre platziert. Die Differenz zwischen kontra- und ipsilateralem ADC ergab den entsprechenden Abfall des ADC.

1.9.2.4 Quantitative T2-Bildgebung

Um das in der subakuten Phase nach Hirninfarkten in Folge des Zusammenbruchs der Blut-Hirn-Schranke entstehende, vasogene extrazelluläre Ödem darzustellen, wurde eine T2-gewichtete CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill)-Spinecho-Sequenz durchgeführt (FOV 37 x 37 mm, Matrixgröße 512 x 256, TR = 3833,5 ms, TE = 18 bis 216 (6 Schichten mit 2 mm Schichtdicke, 12 Echos mit Schrittgrößen von $\Delta TE = 18$ ms), 90° Anregungswinkel, 180° Refokussierungspuls, number of excitations = 1) (Kato et al., 1986).

Zur Bestimmung der T2-Relaxationszeit erfolgte analog der Ermittlung des ADC mittels der Software Paravision 5.1 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) das Setzen der ROI in den Schichten mit Hirninfarkt jeweils kortikal und subkortikal im Zentrum der ischämischen Läsion. Die Position der ROI wurde wie auch bei der diffusionsgewichteten Bildgebung ebenfalls in der kontralateralen Hemisphäre beibehalten, um die T2-Relaxationszeiten zwischen gesunder und betroffener Hemisphäre vergleichen zu können.

1.9.2.5 *Planimetrische Auswertung der Läsionsvolumina und der Mittellinienverlagerung*

Zur Quantifizierung der Läsionsvolumina wurden mit Hilfe einer Bildanalyse-Software (Image J 1.46; National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Vereinigte Staaten) die koronaren T2-Schnittbilder vermessen. Infarktareale stellten sich dabei als hyperintense Gebiete dar (Gill et al., 1995; Quast et al., 1993; Seega und Elger, 1993; Allegrini und Sauer, 1992).

Zunächst wurden die Flächen beider Hemisphären und des Infarktes in allen sechs koronaren Schnittbildern gemessen (Abb. 3-11). Durch Multiplikation aller Schichten mit der Schichtdicke (2 mm) und anschließender Multiplikation erhielt man das Volumen der zum Infarkt kontralateralen Hemisphäre (HV_c , engl. contralateral hemispheric volume), der ipsilateralen Hemisphäre (HV_i , engl. ipsilateral hemispheric volume) und des Infarktes (LV, engl. lesion volume).

Für die Berechnungen des prozentualen Läsionsvolumens (%HLV, engl. hemispheric lesion volume) und des prozentualen ödemkorrigierten Läsionsvolumens (%HLV_{ec}, engl. edema corrected hemispheric lesion volume) wurden die Formeln 1 und 2 verwendet (Gerriets et al., 2004a):

$$\%HLV = ((2 * LV)/(HV_c + HV_i)) * 100 \quad (1)$$

$$\%HLV_{ec} = ((HV_c - HV_i + LV)/HV_c) * 100 \quad (2)$$

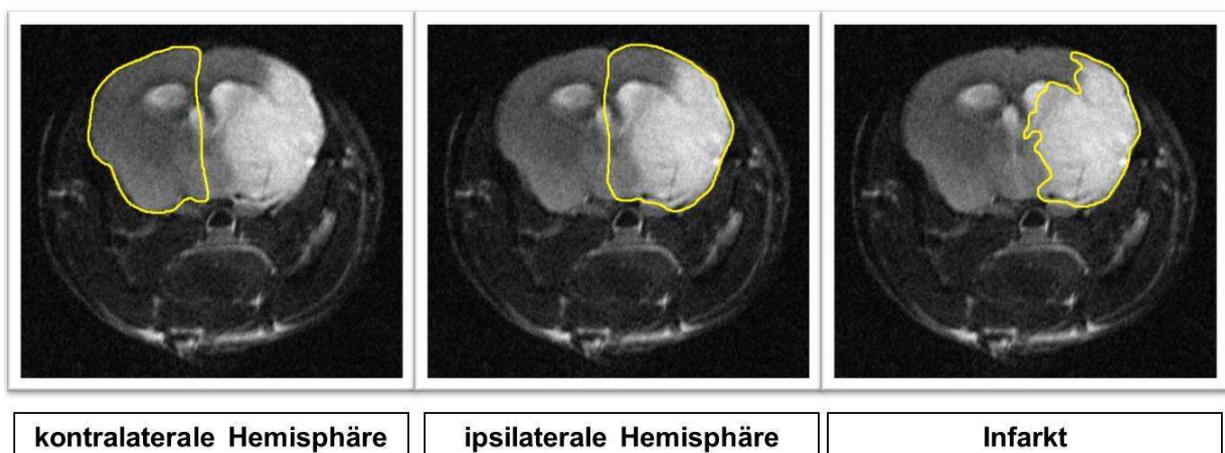


Abb. 3-11: Messung der Flächen der kontra- und ipsilateralen Hemisphäre sowie des Infarktes

Die Mittellinienverlagerung (MLS, engl. midline shift), die quantitativ den Anteil des vasogenen Hirnödems widerspiegelt (Walberer et al., 2007), wurde anhand des T2-Schnittbildes vermessen, auf welchem der dritte Hirnventrikel sichtbar war. Der Abstand zwischen des äußeren kortikalen Randes und der Mitte des dritten Ventrikels wurde sowohl ipsi- (A) als auch kontralateral (B) an der Stelle des maximalen lateralen Abstandes des Ventrikels vermessen (Walberer et al., 2007) (Abb. 3-12).

Anschließend wurde die MLS mittels Formel 3 berechnet (Gerriets et al., 2001; Gerriets et al., 1999; Stolz et al., 1999):

$$\text{MLS} = (A - B)/2 \quad (3)$$

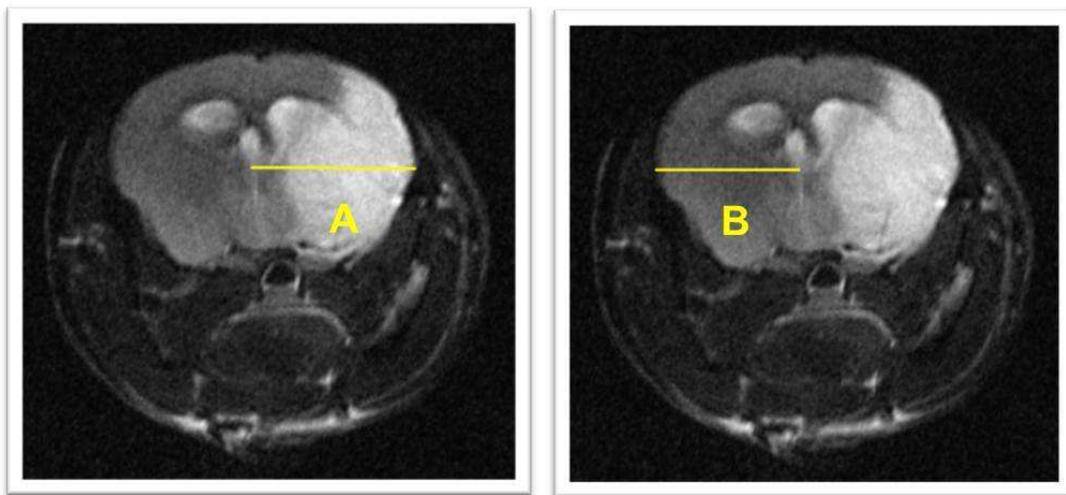


Abb. 3-12: Ipsi- (A) und kontralaterale (B) Messung des Abstandes zwischen Kortextrand und Mittellinie

1.10 Postmortale Präparations- und Entnahmetechniken

Die Tiere aus Experiment III wurden im Anschluss an die MRT-Messungen im Exsikkator mittels 5 Vol.-% Isofluran in 3,0 l/min Druckluft in tiefe Narkose gebracht. Nach Eintreten der Schnappatmung – mindestens jedoch nach 5 min in tiefer Narkose – erfolgte die Dekapitation mittels Guillotine.

1.10.1 Intrakardiale Perfusion

Nach Abschluss der letzten Laser-Doppler-Messung wurden die Tiere aus den Experimenten I und II in Rückenlage gebracht und die Isoflurannarkose auf 5 Vol.-% in 3,0 l/min Druckluft erhöht. Nach Einsetzen der Schnappatmung – mindestens aber 5 min nach Erhöhung der Narkose – wurde der Brustkorb via Bauchhöhle und Diaphragma eröffnet. Mit einer 23G Safety-Multifly®-Kanüle (Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland) wurde der linke Herzventrikel punktiert, heparinisierte isotone Kochsalzlösung (25.000 IE Heparin (Heparin-Natrium Braun 25.000 IE/5 ml; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) auf 500 ml 0,9% NaCl-Lösung) in das Gefäßsystem infundiert und mittels Scherenschnitt das rechte Herzohr eröffnet. Die Perfusion erfolgte solange (zwischen 20 und 30 min), bis die aus dem Schnitt im rechten Herzohr austretende Flüssigkeit klar war und keine Blutbestandteile mehr enthielt. Nach Beendigung der Perfusion wurde die Punktionskanüle entfernt.

1.10.2 Probenvorbereitung für die Mikro-CT-Bildgebung

Nach Abschluss der intrakardialen Perfusion wurde der Brustkorb des Versuchstieres ungefähr mittig entlang der Rippen abgesetzt. Es erfolgten Ligaturen des Aortenbogens an seinem Ursprung aus dem Herzen sowie zwischen den Abgängen der A. carotis communis sinistra und der A. subclavia sinistra. Weiterhin wurde der Truncus brachiocephalicus (A. innominata) an seinem Abgang aus dem Arcus aortae und die A. carotis externa sinistra ligiert (Abb. 3-13).

Zur Darstellung der zerebralen Gefäße im Mikro-Computertomografen (Mikro-CT) kam das bleihaltige Röntgenkontrastmittel Microfil® (Flow Tech Inc., Carver, Massachusetts, Vereinigte Staaten) zum Einsatz. 5 ml MV-122 yellow (Basis) und 5 ml MV Diluent (Verdünner) wurden mit 0,5 ml MV Curing Agent (Aushärter) für 3 min mit einem Magnetrührer vermischt und anschließend über eine 20G Sterican®-Kanüle in eine 10 ml Spritze (beide B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) aufgezogen. Anschließend wurde das so angemischte Röntgenkontrastmittel mit einer 23G Safety-Multifly® Kanüle über den Aortenbogen in das Gefäßsystem der Ratte mit leichtem Druck injiziert (Abb. 3-13).

Zur Beurteilung der Perfusion mit Microfil® dienten neben dem Austreten des Mittels aus dem rechten Herzhorn auch die Einfärbung der Tracheal-, Masseter- und Episkleralgefäße.

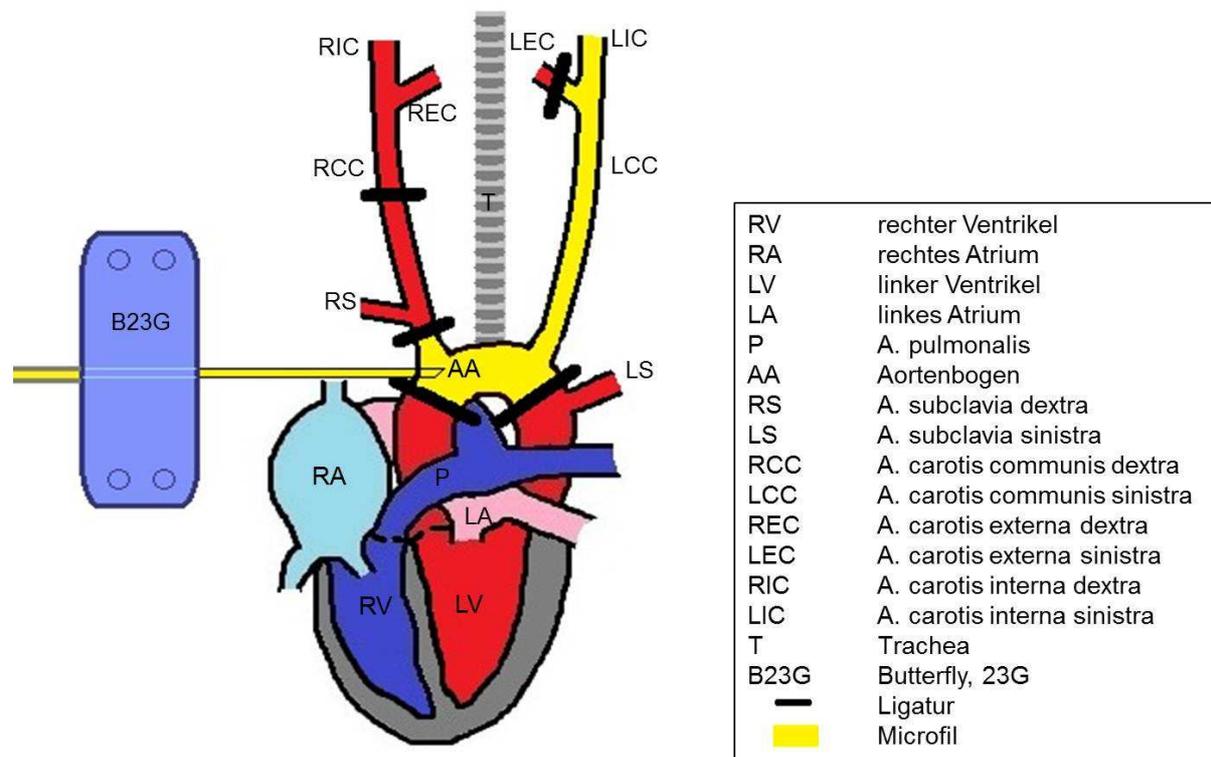


Abb. 3-13: Schematische Darstellung der Microfil®-Applikation in den Aortenbogen, die angebrachten Ligaturen der Gefäßabgänge sind als solche kenntlich gemacht

1.10.3 Probenentnahme

Nach einer Aushärtungszeit des Kontrastmittels von 45 bis 60 min wurde das Versuchstier mittels Guillotine dekapitiert.

Zur Entnahme der Gehirne der Tiere aus den Experimenten I und II wurde der bereits für die Laser-Doppler-Messungen erfolgte Hautschnitt mit einer Schere nach rostral erweitert. Anschließend wurden die Hautlappen jeweils nach lateral weggezogen. Über das Foramen magnum wurde nun das Os occipitale mit einer Schere auf 2 und 10 Uhr eingeschnitten. Das Knochenstück zwischen den Schnitten wurde mit einem zur Knochenzange umfunktionierten Nadelhalter nach Mathieu (Chr. Diener GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) entfernt, wodurch das Zerebellum sichtbar wurde. Nach vorsichtiger Abpräparation des Os interparietale kam der Sinus transversus in Sicht. Zur weiteren Freilegung des Zerebrums wurde

nun ein Schenkel des Nadelhalters unterhalb der Sutura sagittalis dicht entlang des Knochens eingeführt. Die Sutura sagittalis konnte so mit leichten Drehbewegungen des Nadelhalters gelockert werden, wodurch die Entfernung der Ossa parietalia und der Ossa frontalia ohne Schädigungen der darunterliegenden Dura mater möglich wurde. Nachdem rostral der Bulbus olfactorius sichtbar wurde, erfolgte die Trennung von Zerebrum und Bulbus olfactorius mit Hilfe einer Mikroschere und eines Spatels. Anschließend wurde das Gehirn ohne Bulbus olfactorius mit Hilfe des Spatels vorsichtig nach kaudal weggeklappt. Basal wurden mittels Mikroschere die Abgänge der Hirnnerven gekappt und eventuelle Anhaftungen der Dura mater am Knochen vorsichtig gelöst. Dann konnte das Gehirn mitsamt den Hirnhäuten aus der Schädelkalotte entnommen werden und wurde bis zur Durchführung der Untersuchungen mittels Mikro-CT in 4%iger Formaldehydlösung (Roti®-Histofix 4%, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bei 4°C aufbewahrt (Abb. 3-14).

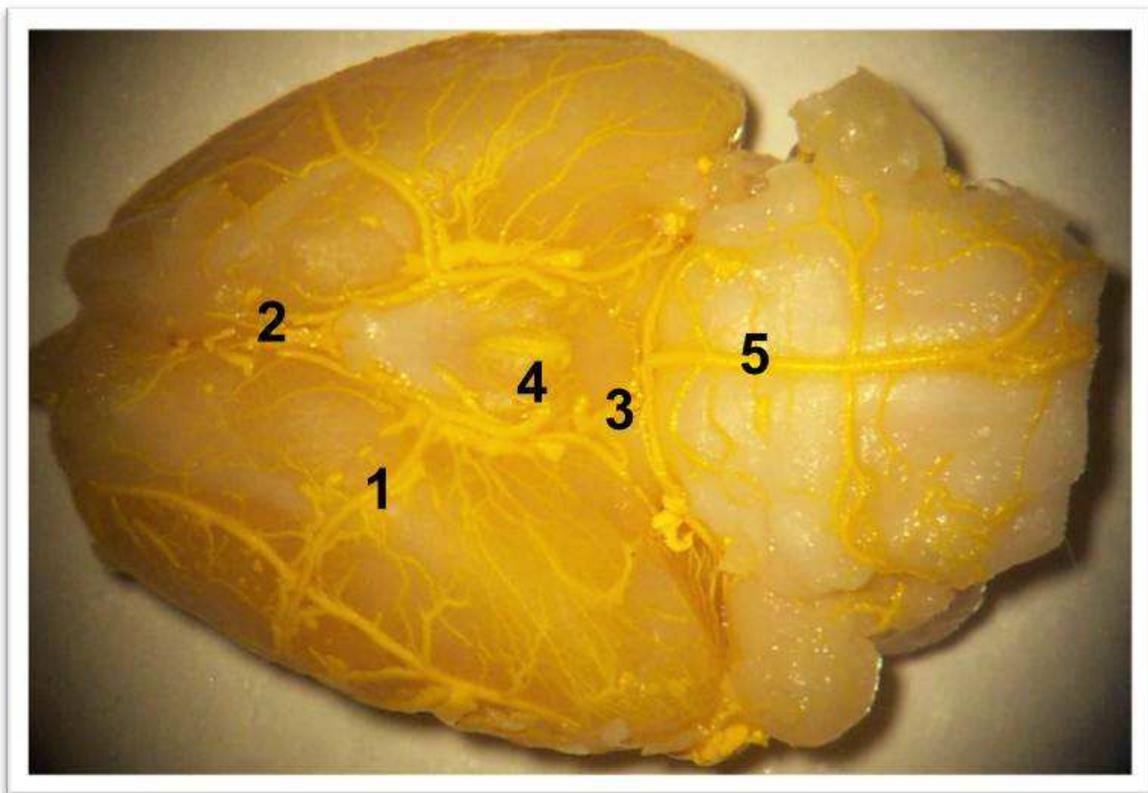


Abb. 3-14: Basale Ansicht auf ein Rattengehirn, dessen Gefäßsystem mit Microfil® gefüllt ist; (1) A. cerebri media, (2) A. cerebri anterior/rostralis, (3) A. cerebri posterior/caudalis, (4) A. carotis interna, (5) A. basilaris

1.11 Mikro-Computertomografie

Die Gehirne der Tiere des Experimentes I wurden zunächst mit dem frontalen Kortex auf dem Probenhalter des Mikro-CT fixiert, gescannt (SkyScan® 1072, 80 kV; Skyscan, Kontich, Belgien) und damit die mit Röntgenkontrastmittel gefüllten Gefäße des Gehirnes dargestellt (Langheinrich et al., 2004; Nedelmann et al., 2010) (Abb. 3-15 (A)).

Anschließend wurde aus jedem Gehirn mittig im Bereich des Stromgebietes der A. cerebri media ein 3 mm dickes Stück herausgeschnitten und auf der linken Seite stehend auf dem Probenhalter des Mikro-CT fixiert und abermals gescannt (Abb. 3-15 (B)).

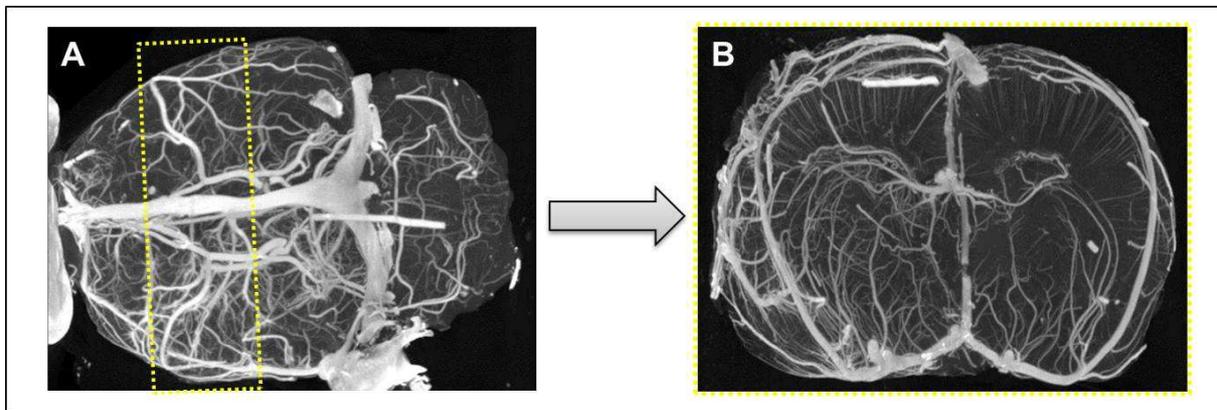


Abb. 3-15: Darstellung des kompletten Gehirns (A) und des Teilstücks des Stromgebietes der A. cerebri media (B) mit dem Mikro-CT

Mittels der Software Skyscanner Dataviewer (Skyscan, Kontich, Belgien) wurden nun sowohl im rechten und linken Kortex als auch im rechten und linken Striatum jeweils Regions of Interest (ROI) bestimmt (Abb. 3-16).

Das Gefäßvolumen dieser ROI wurde mittels der Software Analyze™ 9.0 (Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Minnesota, Vereinigte Staaten) als absolutes Volumen in mm^3 des rechten und linken Kortex und des rechten und linken Striatums berechnet. Die Addition der absoluten Volumina des linken Kortex und Striatums sowie des rechten Kortex und Striatums ergab das totale Gefäßvolumen der beiden Hemisphären in mm^3 .

Für den Seitenvergleich der Hemisphären innerhalb einer Gruppe wurde abschließend das Gefäßvolumen der linken, gesunden Hemisphäre auf 100% gesetzt und das Gefäßvolumen der rechten, ischämischen Hemisphäre entsprechend prozentual berechnet.

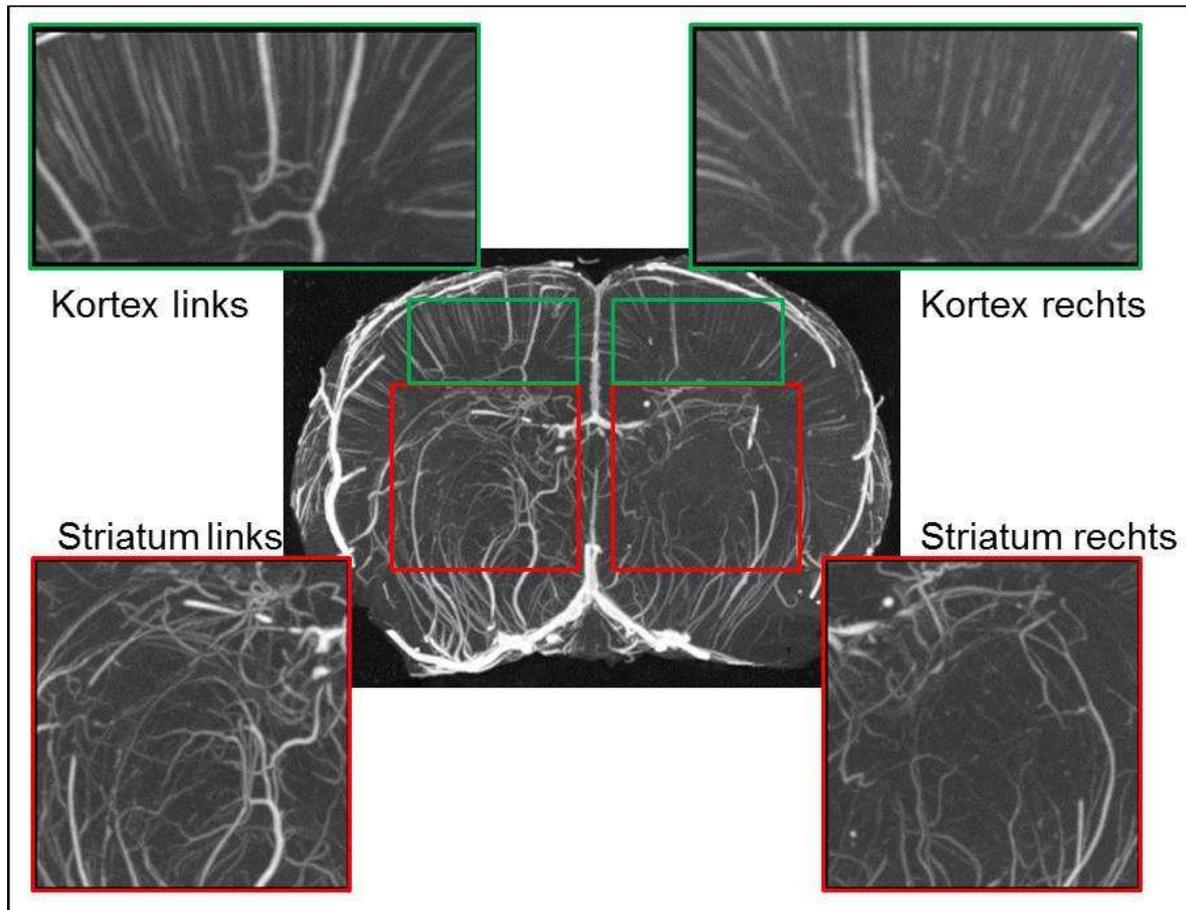


Abb. 3-16: Regions of Interest im Stromgebiet der A. cerebri media

2. Studiendesign

2.1 Experiment I: Mikroläschenverstärkte Sonothrombolyse im mikrovaskulären Ischämie-Reperfusion-Fadenmodell

2.1.1 Ziel

Dieses Experiment hatte das Ziel, die Effekte zweier Mikroläschenpräparate (BR38 und BR1) auf das zerebrale Gefäßvolumen in jeweils zwei unterschiedlichen Dosierungen bei der 60-minütigen sonothrombolytischen Therapie nach transientem, ischämischen Gefäßverschluss zu bestimmen.

2.1.2 Ablauf des Experimentes

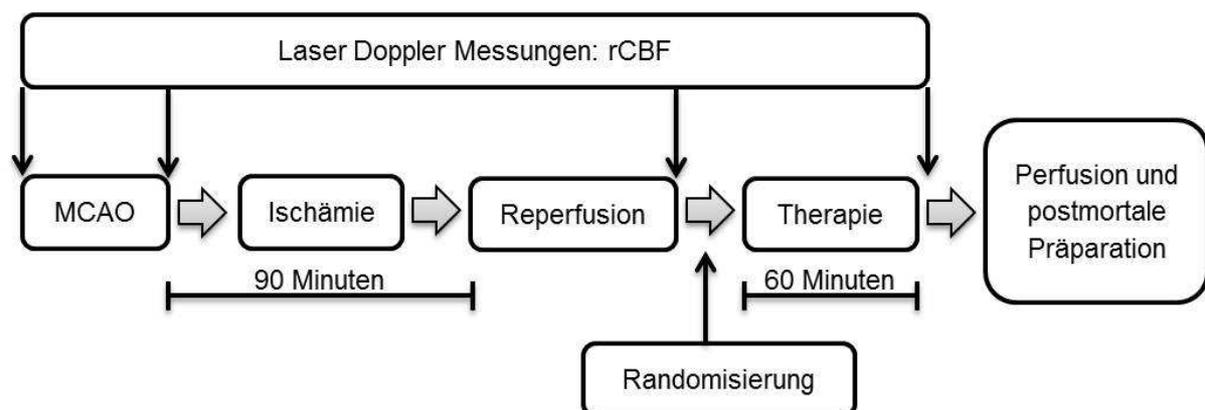


Abb. 3-17: Studienablauf Experiment I

Nach der Einleitung der Narkose wurde bei den WU dieses Experimentes zunächst die Baseline Laser-Doppler-Messung des rCBF (rCBF Baseline) durchgeführt. Anschließend erfolgte der transiente Verschluss der ACM mittels Fadenmodell über die ACC. Zur Überprüfung des Operationserfolges (Abfall des rCBF) wurde eine weitere Laser-Doppler-Messung durchgeführt (rCBF post Okklusion). Die Reperfusion der ACM wurde nach einer Ischämiedauer von 90 min eingeleitet. Aufgrund des „No Reflow“-Phänomens bleiben bei diesem Modell jedoch die mikrovaskulären Gefäßanteile weiterhin verschlossen beziehungsweise sind minder- bis nicht durchblutet. Nach abermaliger Messung des rCBF (post Reperfusion) wurden die Tiere in die Studiengruppen randomisiert (siehe Kapitel 2.1.3) und es

erfolgte je nach Einteilung die 60-minütige Therapie mit oder ohne den mikrobäschenhaltigen Echosignalverstärkern BR38 und BR1 (siehe Kapitel 2.1.4). Nach Beendigung der Therapie wurde nochmals der rCBF gemessen (post Therapie). Im Anschluss wurden die Tiere in tiefe Narkose gelegt, die transkardiale Perfusion eingeleitet und die Gehirne für die Messungen mit dem Mikro-CT präpariert und entnommen (Abb. 3-17).

2.1.3 Studiengruppeneinteilung

Die WU wurden in sechs Studiengruppen eingeteilt (Tab. 3-3).

Der positive Effekt des Präparates BR1 auf das zerebrale Gefäßvolumen konnte bei den gewählten Ultraschalleinstellungen zusammen mit der Gabe von rt-PA und bei voller Dosierung (Gruppe E) bereits in einer früheren Studie nachgewiesen werden (Nedermann et al., 2010). Die Gruppe E diente daher als Nachweis der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dieser früheren Studie. Die Gruppen D und F wurden untersucht, um mögliche Dosiseinsparungen der Mikrobäschenpräparate zu evaluieren.

Gruppe	Bezeichnung	3 MHz Ultraschall	rt-PA	BR38	BR1	Isotone Kochsalzlösung
A	Kontrolle	-	-	-	-	X
B	rt-PA	-	X	-	-	X
C	Volle Dosis BR38	X	X	X	-	-
D	1/3 Dosis BR38	X	X	X	-	-
E	Volle Dosis BR1	X	X	-	X	-
F	1/3 Dosis BR1	X	X	-	X	-

Tab. 3-3: Studiengruppeneinteilung Experiment I

2.1.4 Ablauf der Therapie

Über die 60 min Dauer der Therapie wurden den Tieren entsprechend der Gruppenteilung das rt-PA alle 5 min und die Mikrobäschenpräparate alle 15 min intravenös verabreicht. Die Tiere aus der Gruppe A (Kontrolle) erhielten zu den Zeitpunkten die entsprechende Menge an isotoner Kochsalzlösung injiziert. Die Ultraschallsonde wurde zwar positioniert, eine Beschallung fand jedoch nicht statt. Bei den Tieren aus der Gruppe B (rt-PA) fand ebenfalls keine Beschallung statt. Anstelle der Verabreichung der Mikrobäschenpräparate wurde lediglich isotone Kochsalzlösung appliziert. Die rt-PA-Gaben fanden entsprechend der anderen Gruppen alle 5 min statt (Abb. 3-18).

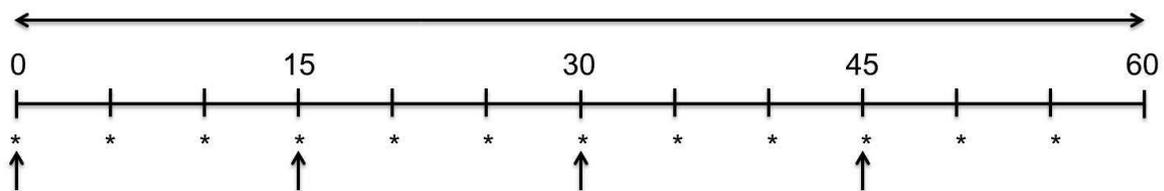


Abb. 3-18: Zeitlicher Ablauf der 60-minütigen Therapie (↑ BR1/BR38, * rt-PA, ↔ 3 MHz Ultraschall)

2.1.5 Einschlusskriterien

Da in diesem Experiment weder eine begleitende Bildgebung des Gehirns, noch eine klinisch-neurologische Untersuchung (z.B. deutliche Hemiparese als Anzeichen eines vorhandenen Infarktes) stattfinden konnte, wurde der Abfall des rCBF bei den Laser-Doppler-Messungen post Okklusion im Vergleich zu den Baseline-Messungen als Indikator für einen erfolgreichen Verschluss der MCA herangezogen. Der rCBF musste für einen Studieneinschluss auf oder unter 80% des Baseline-Wertes fallen.

2.1.6 Abbruch- und Ausschlusskriterien

Bei Auftreten unstillbarer Blutungen während der Operation sowie beim Durchbruch des dünngefrästen Schädelknochens wurde das Experiment abgebrochen. Weiterhin wurden Tiere ausgeschlossen, bei denen sich der Okkluder nicht über 18 mm vorschieben ließ und bei denen zusätzlich der rCBF-Wert nach Okklusion nicht auf

oder unter 80% des Baseline-Wertes fiel. Auch Tiere, bei denen mit dem Okkluder eine SAB verursacht wurde (Vorschub des Okkluders über 22 mm sowie visuelle Bestätigung der Blutung nach der Gehirnentnahme am Ende des Experimentes), wurden nicht in die Studie aufgenommen. Weiterhin wurden Tiere ausgeschlossen, bei denen während der Therapie die V. coccygea lateralis obliterierte und damit die Substanzgaben nicht vollständig gewährleistet werden konnten.

Alle ausgeschlossenen Tiere wurden nachrandomisiert.

2.1.7 Datenanalyse und statistische Auswertung

Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit 5% gewählt (statistisch signifikanter Unterschied bei einem p-Wert $<0,05$). Die statistische Analyse wurde mit Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten) vorgenommen. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit einem einseitigen t-Test (gepaarte Stichproben) ermittelt.

2.2 Experiment II: Mikrobläschenverstärkte Sonothrombolyse im makrovaskulären Thrombemboliemodell

2.2.1 Ziel

Ziel dieses Experimentes war es, die Effekte des Mikrobläschenpräparates BR38 auf die zerebrale Blutversorgung bei der 60-minütigen Sonothrombolyse nach thrombotisch-embolischem Karotis-T-Verschluss (makrovaskulärer Verschluss) zu untersuchen.

2.2.2 Ablauf des Experimentes

Der Ablauf dieses Experimentes war ähnlich des Experimentes I. Zunächst wurde an den narkotisierten SHR der Baseline-rCBF-Wert mittels Laser-Doppler-Messung durchgeführt. Dann erfolgte der Verschluss des Karotis-T mit dem Thrombemboliemodell (MCAO) mit anschließender Erfolgskontrolle durch Messung

des rCBF post Okklusion. Nach 90 min wurde abermals eine Laser-Doppler-Messung durchgeführt (rCBF prä Therapie) und die Tiere wurden in die Therapiegruppen randomisiert (siehe Kapitel 2.2.3). Nach erfolgter 60-minütiger Therapie wurde abermals der rCBF gemessen (post Therapie). Abschließend wurden die Tiere in tiefe Narkose gelegt und wie die Tiere aus Experiment I zunächst transkardial perfundiert. An die Perfusion anschließend wurden die Gehirne nach der postmortalen Präparation entnommen und makroskopisch beurteilt (Abb. 3-19).

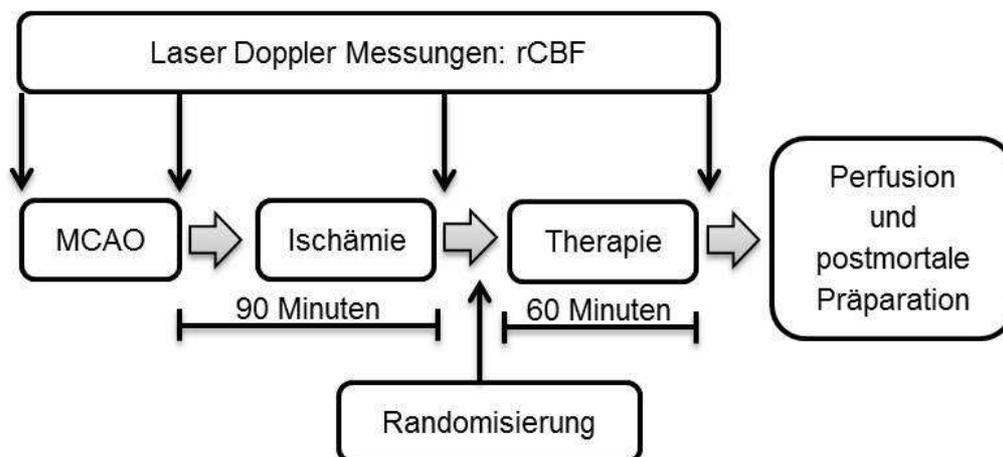


Abb. 3-19: Studienablauf Experiment II

2.2.3 Studiengruppeneinteilung

Die SHR wurden in drei Studiengruppen eingeteilt (Tab. 3-4).

Gruppe	Bezeichnung	3 MHz Ultraschall	rt-PA	BR38	Isotone Kochsalzlösung
A	Kontrolle	-	-	-	X
B	rt-PA	-	X	-	X
C	Volle Dosis BR38	X	X	X	-

Tab. 3-4: Studiengruppeneinteilung Experiment II

2.2.4 Ablauf der Therapie

Die 60-minütige Therapie erfolgte analog der des Experimentes I (siehe Kapitel 2.1.4). Die Ultraschallbehandlung fand nur bei Gruppe C statt, bei den Tieren der anderen Gruppen wurde lediglich die Sonde platziert, ohne das Gerät anzuschalten. Anstelle der rt-PA- und BR38-Gaben wurde die entsprechende Menge an isotoner Kochsalzlösung verabreicht.

2.2.5 Einschlusskriterien

Auch in Experiment II diente die Laser-Doppler-Messung post Okklusion als Anhaltspunkt für den Erfolg der MCAO. Ebenfalls wie in Experiment I wurden nur Tiere in die Studie eingeschlossen, deren rCBF post Okklusion auf oder unter 80% des Ausgangswertes gefallen war.

2.2.6 Abbruch- und Ausschlusskriterien

Die Abbruchkriterien dieses Experimentes entsprachen denen des Experimentes I (unstillbare Blutung während der Operation, Durchbruch des dünngefrästen Schädelknochens). Weiterhin wurden Tiere ausgeschlossen, bei denen mit dem Katheter, mit dem der Thrombus in das Karotis-T eingebracht wurde, eine SAB verursacht wurde (visueller Nachweis der Blutung *post mortem* nach Gehirnentnahme). Konnten aufgrund einer obliterierten V. coccygea lateralis die rt-PA- und BR38-Gaben nicht vollständig gewährleistet werden, wurde das Experiment ebenfalls abgebrochen.

Auch bei diesem Experiment wurden sämtliche ausgeschlossenen Tiere ersetzt.

2.2.7 Datenanalyse und statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte analog zu der des Experimentes I (siehe Kapitel 2.1.7).

2.3 Experiment III: Einfluss der Bläschengröße bei zerebralen Luftmikroembolisationen

2.3.1 Ziel

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um den Einfluss unterschiedlich großer Luftbläschen in der zerebralen Zirkulation zu evaluieren. Das insgesamt injizierte Luftvolumen (85,8 nl) wurde hierbei als Konstante gewählt und dementsprechend die Anzahl der Luftbläschen bei den zwei gewählten Größen variiert (1800 Bläschen, 45 µm groß; 40 Bläschen, 160 µm groß).

2.3.2 Ablauf des Experimentes

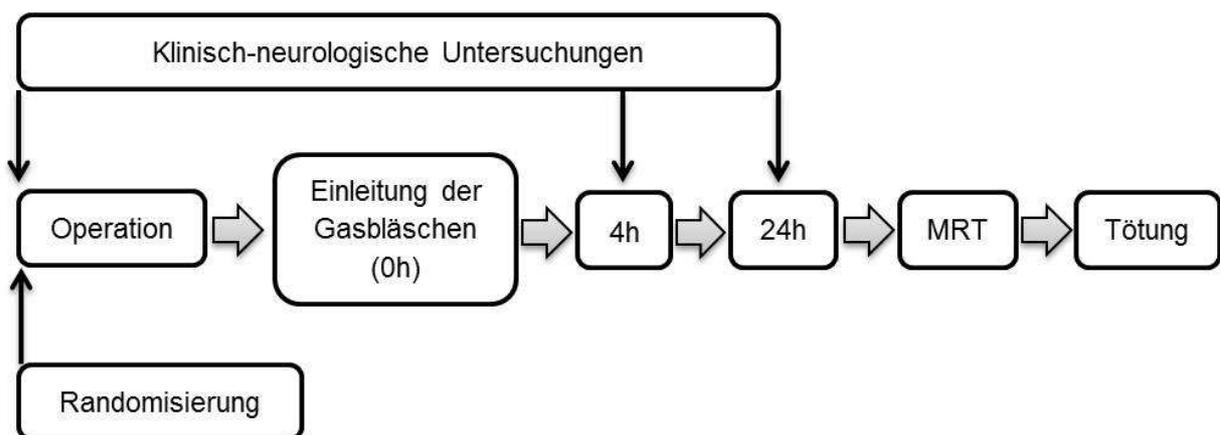


Abb. 3-20: Studienablauf Experiment III

Zunächst wurden die WU klinisch-neurologisch untersucht und anschließend wie beschrieben narkotisiert. Es erfolgte die Randomisierung in die Gruppen (siehe Kapitel 2.3.3). Vor der Vorbereitung der Halsgefäße für die Einleitung der Gasbläschen wurde den Tieren ein Katheter in die A. coccygea gelegt. Aus diesem Schwanzarterienkatheter wurde den Tieren Blut für eine arterielle Blutgasanalyse entnommen und anschließend wurde der arterielle Blutdruck über diesen Zugang bestimmt. Dann erst erfolgte die Präparation der Halsgefäße mit der anschließenden Einleitung der Luftbläschen (Gesamtluftvolumen: 85,8 nl) in isotoner Kochsalzlösung. Nach abschließender Versorgung der Halsgefäße und dem Wundverschluss wurde die Sonde zur Messung des Blutdruckes entfernt und abermals eine arterielle Blutprobe zur Blutgasanalyse aus dem Schwanzarterienkatheter entnommen. Nach

Versorgung des Schnittes im Schwanz wurde die Narkose beendet. Die Tiere wurden bis zum vollständigen Erwachen gewärmt und anschließend in ihren Ursprungskäfig zurückgesetzt. 4 h sowie 24 h nach Einleitung der Gasbläschen erfolgten weitere klinisch-neurologische Untersuchungen. Nach der Untersuchung 24 h nach Einleitung der Gasbläschen wurden die Tiere dann mittels MRT untersucht und anschließend getötet (Abb. 3-20).

2.3.3 Studiengruppeneinteilung

Wie aus Tab. 3-5 hervorgeht, wurden die WU in drei Studiengruppen eingeteilt.

Gruppe	Bezeichnung	Anzahl der Bläschen	Größe der Bläschen	Isotone Kochsalzlösung
A	Sham-operiert	-	-	X
B	Kleine Bläschen	1800	45 μm	X
C	Große Bläschen	40	160 μm	X

Tab. 3-5: Studiengruppeneinteilung Experiment III

2.3.4 Abbruch- und Ausschlusskriterien

Unstillbare Blutungen während der Operation hatten auch hier den Abbruch des Experimentes zu Folge. Außerdem wurde auch bei technischen Problemen während der Einleitung der Gasbläschen abgebrochen (Veränderungen der Strömungsgeschwindigkeit, die mit einer Erhöhung des benötigten Spüllösungsvolumens aufgrund der längeren Einleitungszeit einhergingen (Ausschluss bei Zeiten über 2 min 30 sec), Abweichungen von der eigentlichen Bläschengröße um im Durchschnitt mehr als 5 μm und Größenabweichungen von mehr als 25 μm bei 5% oder mehr der Bläschen). Als weiteres Abbruchkriterium wurde festgelegt, dass auch Tiere, die sich nach der Aufwachphase innerhalb der ersten 5 h oder nach 24 h in Seitenlage befanden oder eine schwere Dyspnoe zeigten, von der Studie ausgeschlossen und bei diesen Symptomen sofort euthanasiert wurden.

Aus der Studie ausgeschlossene Tiere wurden nachrekrutiert.

2.3.5 Datenanalyse und statistische Auswertung

Zum Nachweis der Normalverteilung der Daten wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test durchgeführt. Die Homogenität der Varianz wurde mittels Levene-Test untersucht. Da es sich um recht kleine Gruppengrößen handelt, wurden die Gruppenunterschiede mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests ermittelt. Im Anschluss wurden die Gruppen noch einer post-hoc Analyse mit dem Mann-Whitney-U-Test unterzogen.

Die Datenanalyse wurde mit der Software SPSS Statistics (Version 16.0 für Microsoft Windows; IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt und die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

IV Ergebnisse

1. Experiment I: Mikrobläschenverstärkte Sonothrombolyse im mikrovaskulären Ischämie-Reperfusion-Fadenmodell

1.1 Gruppenbesetzung

Gruppe	Bezeichnung	Gruppengröße
A	Kontrolle	6
B	rt-PA	6
C	Volle Dosis BR38	6
D	1/3 Dosis BR38	6
E	Volle Dosis BR1	6
F	1/3 Dosis BR1	6

Tab. 4-1: Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen in Experiment I

Für das Experiment I wurden insgesamt 44 WU operiert. Davon konnten gemäß der Einschluss-, Abbruch- und Ausschlusskriterien 36 Tiere in die Studie aufgenommen werden, so dass sich in jeder der sechs Gruppen jeweils sechs Tiere befanden (Tab. 4-1).

1.2 Ausschlusstiere und Komplikationsrate

Acht Tiere wurden aus dem Experiment ausgeschlossen (Tab. 4-2).

Bei zwei Tieren konnte postmortal nach der Gehirnentnahme eine Subarachnoidalblutung (SAB) im Bereich des Karotis-T festgestellt werden. Die Fadentiefe betrug bei beiden Tieren nicht mehr als 22 mm (Tier aus Gruppe D 21 mm, Tier aus Gruppe E 19 mm).

Ein Tier aus Gruppe E wies kurz nach dem Wundverschluss nach der Reperfusion eine starke Schwellung im Halsbereich auf und blutete aus der Halswunde. Es wurde umgehend euthanasiert. Die nachfolgende Sektion ergab, dass sich die Ligatur um die ACC, die sich kranial der Arteriotomie befand, gelöst hatte und es dadurch zur Einblutung in den Halsbereich kam.

Bei weiteren drei Tieren (jeweils eines aus Gruppe B, D und E) war die Füllung der zerebralen Gefäßstrukturen mit Microfil® nicht suffizient genug für die Untersuchung mit dem Mikro-CT.

Bei den restlichen zwei Tieren (Gruppe D und F) obliterierte die V. coccygea lateralis während der Wirkstoffapplikation.

Bei insgesamt 44 operierten Tieren ergibt sich damit eine Komplikationsrate von 18,18%.

Gruppe	Bezeichnung	Ausschlussstiere				Gesamt
		SAB	arterielle Blutung	unvollständige Microfil®-Applikation	obliterierte V. coccygea lateralis	
A	Kontrolle	-	-	-	-	-
B	rt-PA	-	-	1	-	1
C	Volle Dosis BR38	-	-	-	-	-
D	1/3 Dosis BR38	1	-	1	1	3
E	Volle Dosis BR1	1	1	1	-	3
F	1/3 Dosis BR1	-	-	-	1	1
	Gesamt	2	1	3	2	8

Tab. 4-2: Anzahl der aus Experiment I ausgeschlossenen Tiere und Ausschlussgründe

1.3 Auswertung der Laser-Doppler-Messungen

Tab. 4-3 zeigt Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen. Zur besseren Auswertbarkeit und Vergleichbarkeit wurden die Baseline-Messungen vor der Okklusion in jeder Gruppe auf 100% gesetzt und in Abb. 4-1 grafisch aufgearbeitet. Innerhalb einer Gruppe ergaben die nachfolgenden Messungen im Vergleich zu den Baseline-Werten alle signifikant kleinere rCBF-Werte ($p < 0,05$).

Gruppe	Bezeichnung	rCBF				
			Baseline	post Okklusion	post Reperfusion	post Therapie
A	Kontrolle	bpu	1203 ± 88	660 ± 76	617 ± 159	789 ± 225
		%	100	55	51	66
B	rt-PA	bpu	1221 ± 99	666 ± 148	816 ± 176	738 ± 317
		%	100	55	67	60
C	Volle Dosis BR38	bpu	1079 ± 71	768 ± 36	816 ± 241	785 ± 319
		%	100	71	75	73
D	1/3 Dosis BR38	bpu	1154 ± 74	739 ± 121	768 ± 222	942 ± 149
		%	100	64	67	82
E	Volle Dosis BR1	bpu	1151 ± 62	591 ± 182	772 ± 180	882 ± 338
		%	100	51	67	71
F	1/3 Dosis BR1	bpu	1186 ± 89	686 ± 181	767 ± 131	871 ± 133
		%	100	58	65	73

Tab. 4-3: Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen (Wert Baseline = 100%)

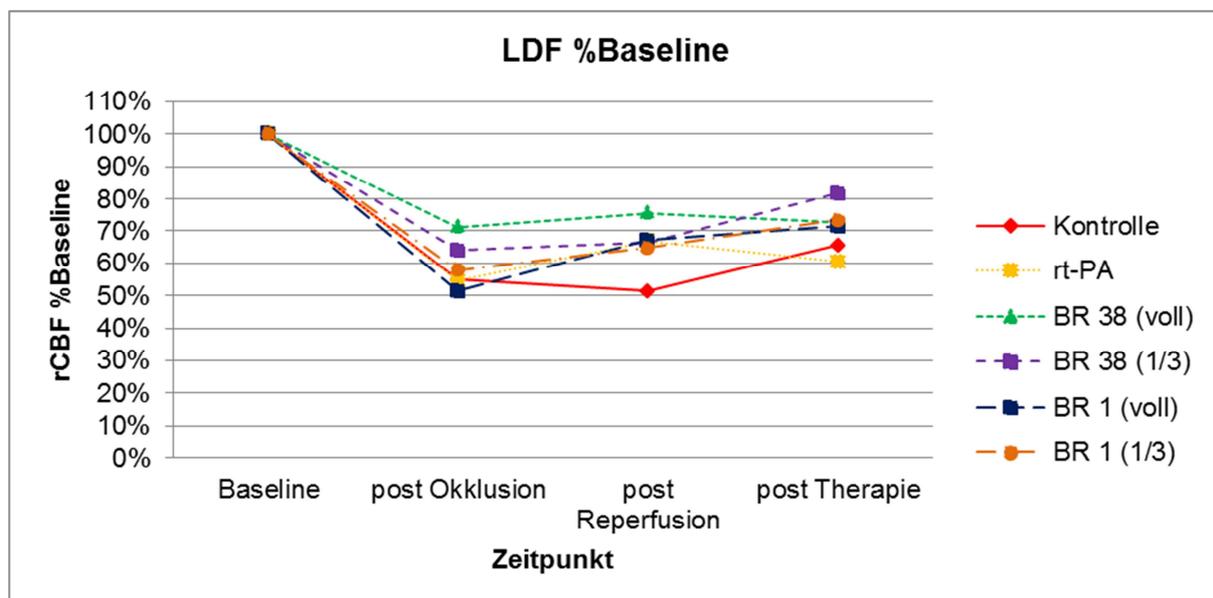


Abb. 4-1: Grafische Darstellung der Laser-Doppler-Messungen (rCBF Baseline = 100%)

Um die therapeutischen Effekte der Mikrobläschenpräparate zu evaluieren, wurde weiterhin der rCBF post Reperfusion auf 100% gesetzt (Tab. 4-4). Abb. 4-2 zeigt die grafische Aufarbeitung. Innerhalb der einzelnen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten vor und nach der Therapie festgestellt werden ($p > 0,05$).

Gruppe	Bezeichnung	rCBF		
			post Reperfusion	post Therapie
A	Kontrolle	bpu	617 ± 159	789 ± 225
		%	100	128
B	rt-PA	bpu	816 ± 176	738 ± 317
		%	100	90
C	Volle Dosis BR38	bpu	816 ± 241	785 ± 319
		%	100	96
D	1/3 Dosis BR38	bpu	768 ± 222	942 ± 149
		%	100	123
E	Volle Dosis BR1	bpu	772 ± 180	882 ± 338
		%	100	106
F	1/3 Dosis BR1	bpu	767 ± 131	871 ± 133
		%	100	114

Tab. 4-4: Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen (Werte post Reperfusion = 100%)

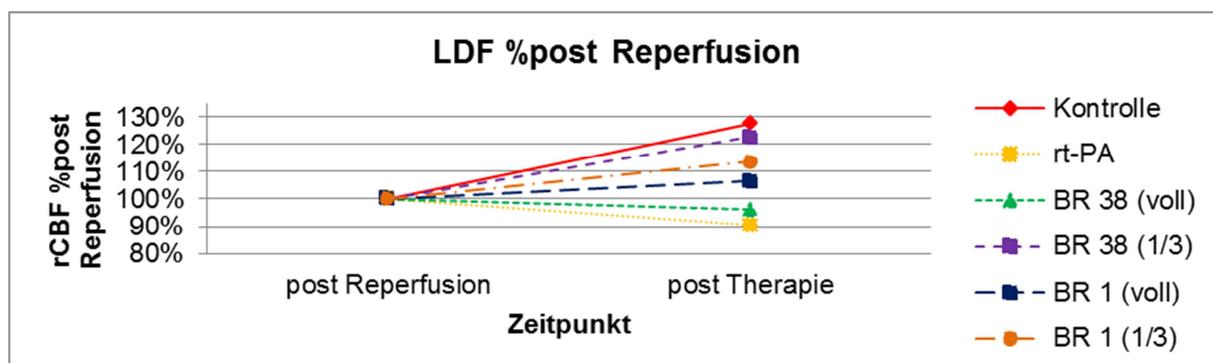


Abb. 4-2: Grafische Darstellung der Laser-Doppler-Messungen (rCBF post Reperfusion = 100%)

1.4 Mikro-CT-Auswertung

Die Auswertung der ROI in den Mikro-CT-Scans ergab die in Tab. 4-5 angegebenen Werte für die absoluten Gefäßvolumina von Striatum und Kortex der jeweiligen Hemisphäre sowie für das totale Gefäßvolumen der Hemisphären.

Die Gruppen A (Kontrolle) und B (rt-PA) zeigen ein signifikant geringeres totales Gefäßvolumen in der rechten Hemisphäre im Vergleich zur linken, gesunden Hemisphäre ($p < 0,05$). Diese Signifikanz existiert in den Mikrobläschengruppen C bis F nicht. Betrachtet man die absoluten Gefäßvolumina des Kortex im Vergleich, so weist die Gruppe C (volle Dosis BR38) ein signifikant kleineres Gefäßvolumen rechts im Vergleich zu links auf ($p < 0,05$). Die Gruppe B (rt-PA) hat einen p-Wert von genau 0,05. In den Gruppen A (Kontrolle) sowie die Mikrobläschengruppen D bis F gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kortexseiten. Im Vergleich der absoluten Volumina des rechten und linken Striatums haben die Gruppen A (Kontrolle) und B (rt-PA) signifikant schlechtere Werte ($p < 0,05$) rechts im Vergleich zu links. Die Mikrobläschengruppen C bis F weisen diese signifikanten Unterschiede nicht auf.

In der grafischen Veranschaulichung der therapeutischen Effekte wurde das mittlere totale Gefäßvolumen der linken, gesunden Hemisphäre jeweils auf 100% gesetzt und die entsprechenden mittleren totalen Gefäßvolumina der rechten Seite prozentual berechnet (Abb. 4-3).

Gruppe	Bezeichnung	Gefäßvolumen (absolut und total)						
			Linke Hemisphäre			Rechte Hemisphäre		
			Kortex	Striatum	Gesamt	Kortex	Striatum	Gesamt
A	Kontrolle	mm ³	0,24	1,07	1,30	0,10	0,66	0,76
		SD	± 0,20	± 0,61	± 0,76	± 0,09	± 0,32	± 0,39
		p				0,11	<0,05	<0,05
		%			100			58
B	rt-PA	mm ³	0,33	1,33	1,66	0,19	0,81	1,00
		SD	± 0,09	± 0,28	± 0,35	± 0,08	± 0,36	± 0,42
		p				0,05	<0,05	<0,05
		%			100			60
C	Volle Dosis BR38	mm ³	0,26	0,93	1,19	0,17	0,83	1,00
		SD	± 0,05	± 0,28	± 0,32	± 0,08	± 0,21	± 0,28
		p				<0,05	0,39	0,18
		%			100			84
D	1/3 Dosis BR38	mm ³	0,24	1,14	1,38	0,17	0,86	1,03
		SD	± 0,08	± 0,21	± 0,28	± 0,11	± 0,23	± 0,30
		p				0,23	0,10	0,11
		%			100			75
E	Volle Dosis BR1	mm ³	0,17	0,81	0,98	0,16	0,61	0,77
		SD	± 0,12	± 0,42	± 0,53	± 0,13	± 0,27	± 0,39
		p				0,80	0,28	0,37
		%			100			79
F	1/3 Dosis BR1	mm ³	0,15	1,01	1,16	0,12	0,80	0,93
		SD	± 0,12	± 0,24	± 0,26	± 0,16	± 0,30	± 0,45
		p				0,64	0,22	0,22
		%			100			80

Tab. 4-5: Absolute Gefäßvolumina der Kortex- und Striatumseiten sowie totales Gefäßvolumen der beiden Hemisphären; absolutes Gefäßvolumen der linken, gesunden Seite = 100%

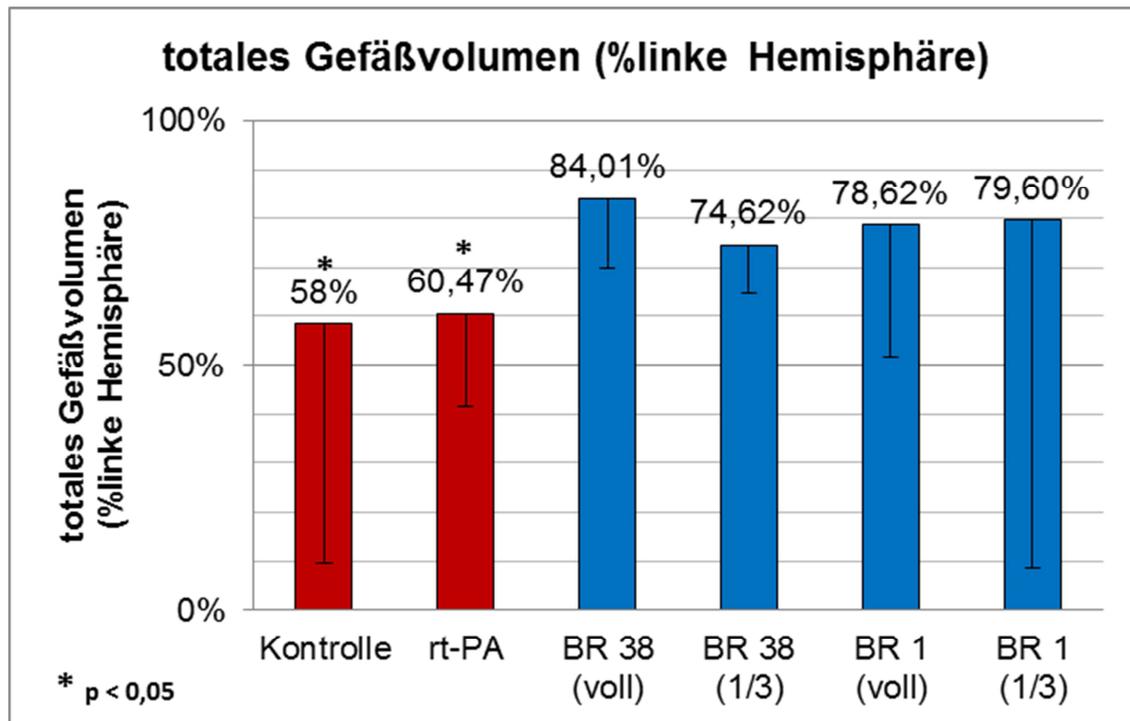


Abb. 4-3: Grafische Darstellung des totalen Gefäßvolumens der rechten Hemisphäre (in % der linken, gesunden Hemisphäre)

2. Experiment II: Mikrobläschenverstärkte Sonothrombolyse im makrovaskulären Thrombemboliemodell

2.1 Gruppenbesetzung

Gruppe	Bezeichnung	Gruppengröße
A	Kontrolle	10
B	rt-PA	10
C	Volle Dosis BR38	11

Tab. 4-6: Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen in Experiment II

Insgesamt wurden für das Experiment II 35 SHR operiert. Davon mussten vier ausgeschlossen werden, so dass insgesamt 31 SHR in die Studie aufgenommen wurden. Jeweils zehn wurden in die Gruppen A und B und elf in die Gruppe C randomisiert (Tab. 4-6).

Die höheren Tierzahlen liegen darin begründet, dass für dieses Studiendesign keine Vorergebnisse wie in Experiment I vorlagen. Die Effektstärke von BR38 bei der Thrombolyse makrovaskulärer Verschlüsse mittels PRP-Thromben in SHR ist unbekannt und es muss prinzipiell auch von einer höheren Streuung der Ergebnisse in Bezug auf das Infarktvolumen ausgegangen werden.

2.2 Ausschlusstiere und Komplikationsrate

Zwei der ausgeschlossenen Tiere wiesen bei der postmortalen Gehirnentnahme am Karotis-T eine SAB auf (Abb. 4-4). Eines der Tiere entstammt der Kontrollgruppe (Abb. 4-4(A)), das andere gehört zur Mikrobäschengruppe (Abb. 4-4(B)).

Bei einem weiteren Tier wurde die ACI beim Vorschieben des Katheters verletzt, so dass es zu einer unstillbaren Blutung kam. Das Tier wurde umgehend euthanasiert.

Beim vierten Ausschlusstier obliterierte die V. coccygea lateralis während der Substanzgaben.

Die Komplikationsrate betrug demnach bei insgesamt 35 operierten SHR 11,43%.

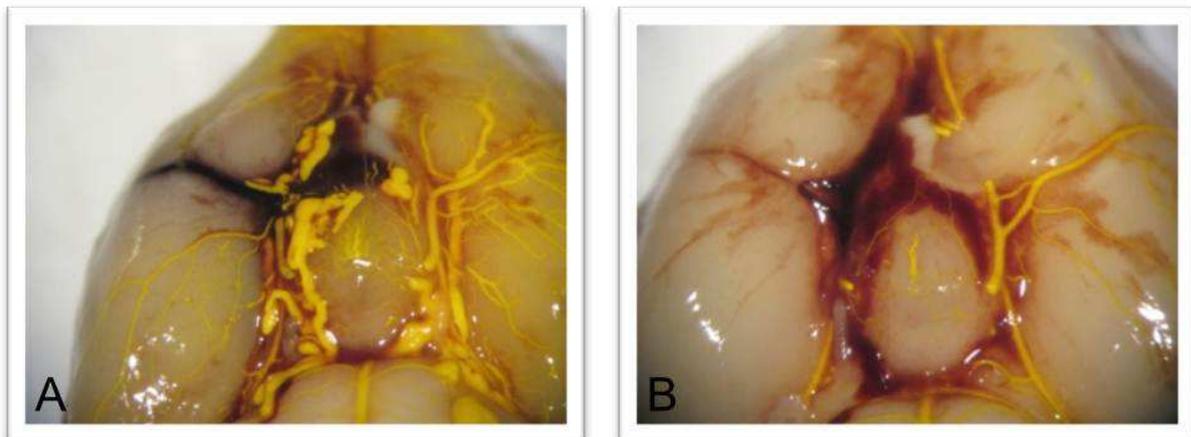


Abb. 4-4: SAB einer SHR aus der Kontrollgruppe (A) und einer SHR aus der Mikrobäschengruppe (B)

2.3 Auswertung der Laser-Doppler-Messungen

Die Auswertung der Laser-Doppler-Messungen im Experiment II findet sich in Tab. 4-7. Auch hier wurden, wie in Experiment I, die Baseline-Messungen auf 100% gesetzt und in Abb. 4-5 grafisch dargestellt. Die rCBF-Werte waren innerhalb aller Gruppen im Verlauf signifikant kleiner im Vergleich zum Ausgangswert ($p < 0,05$).

Gruppe	Bezeichnung	rCBF				
			Baseline	post Okklusion	prä Therapie	post Therapie
A	Kontrolle	bpu	503 ± 166	147 ± 117	142 ± 92	133 ± 110
		%	100	29	28	26
B	rt-PA	bpu	514 ± 200	164 ± 114	91 ± 66	123 ± 95
		%	100	32	18	24
C	Volle Dosis BR38	bpu	524 ± 218	79 ± 63	105 ± 110	146 ± 196
		%	100	15	20	28

Tab. 4-7: Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen (Wert Baseline = 100%)

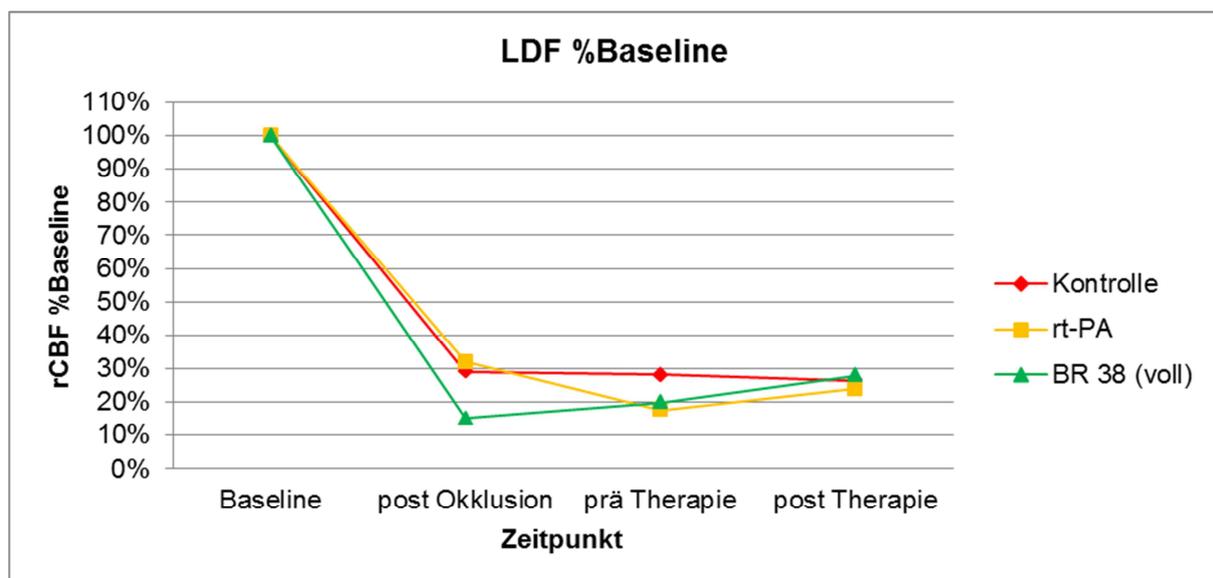


Abb. 4-5: Grafische Darstellung der Laser-Doppler-Messungen (rCBF Baseline = 100%)

Zur Evaluation der therapeutischen Effekte wurde auch hier der rCBF prä Therapie auf 100% gesetzt (Tab. 4-8) und Abb. 4-6 stellt dies grafisch dar. Zwischen den Werten prä und post Therapie gibt es keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$).

Gruppe	Bezeichnung	rCBF		
			prä Therapie	post Therapie
A	Kontrolle	bpu	142 ± 92	133 ± 109
		%	100	94
B	rt-PA	bpu	91 ± 66	123 ± 95
		%	100	135
C	Volle Dosis BR38	bpu	105 ± 110	146 ± 196
		%	100	140

Tab. 4-8: Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen (Werte prä Therapie = 100%)

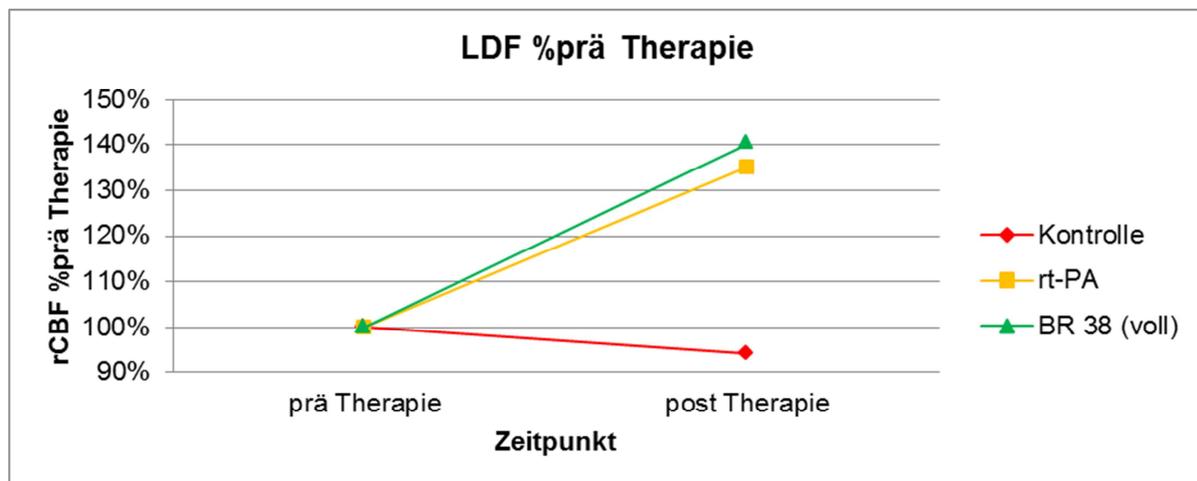


Abb. 4-6: Grafische Darstellung der Laser-Doppler-Messungen (rCBF prä Therapie = 100%)

2.4 *Post mortem*-Befunde

Die makroskopischen Befunde der *post mortem*-Gehirnanalyse finden sich in Tab. 4-9. Bei allen SHR war der mit Evans Blau gefärbte PRP-Thrombus noch vorhanden. In der basalen Ansicht (Abb. 4-7) konnte bei Tier C-04 der BR38-Gruppe kein Thrombus identifiziert werden. Bei diesem Tier saß der Thrombus tief distal in der ACM (laterale Ansicht, Abb. 4-8).

In der basalen Ansicht unterscheiden sich die Gruppen kaum bezüglich auffindbarem Thrombusmaterial (Gruppe A und B je zu 100% mit Thromben, Gruppe C 91% der Tiere mit Thromben). Lateral sind jedoch nur bei 36% der mit BR38 sonothrombolytisch behandelten Tiere Thromben sichtbar, wohingegen dies bei 60% der Kontrolltiere und bei 80% der rt-PA behandelten Tiere der Fall ist.

Gruppe	Bezeichnung	Makroskopische Befunde							
		Basale Ansicht						Laterale Ansicht	
		1		2		Gesamt basal		3	
A	Kontrolle	8	80%	2	20%	10/10	100%	6/10	60%
B	rt-PA	6	60%	4	40%	10/10	100%	8/10	80%
C	Volle Dosis BR38	8	73%	2	18%	10/11	91%	4/11	36%

Tab. 4-9: Makroskopische Befunde der *post mortem*-Gehirnanalyse in Experiment II; (1) Tiere mit Thrombus in der ACI oder der ACI und den proximalen Anteilen der ACA und/oder der ACM, (2) Tiere mit Thrombus in den proximalen Anteilen der ACA und/oder der ACM ohne Beteiligung der ACI, (3) Tiere, bei denen der Thrombus in der lateralen Ansicht sichtbar ist

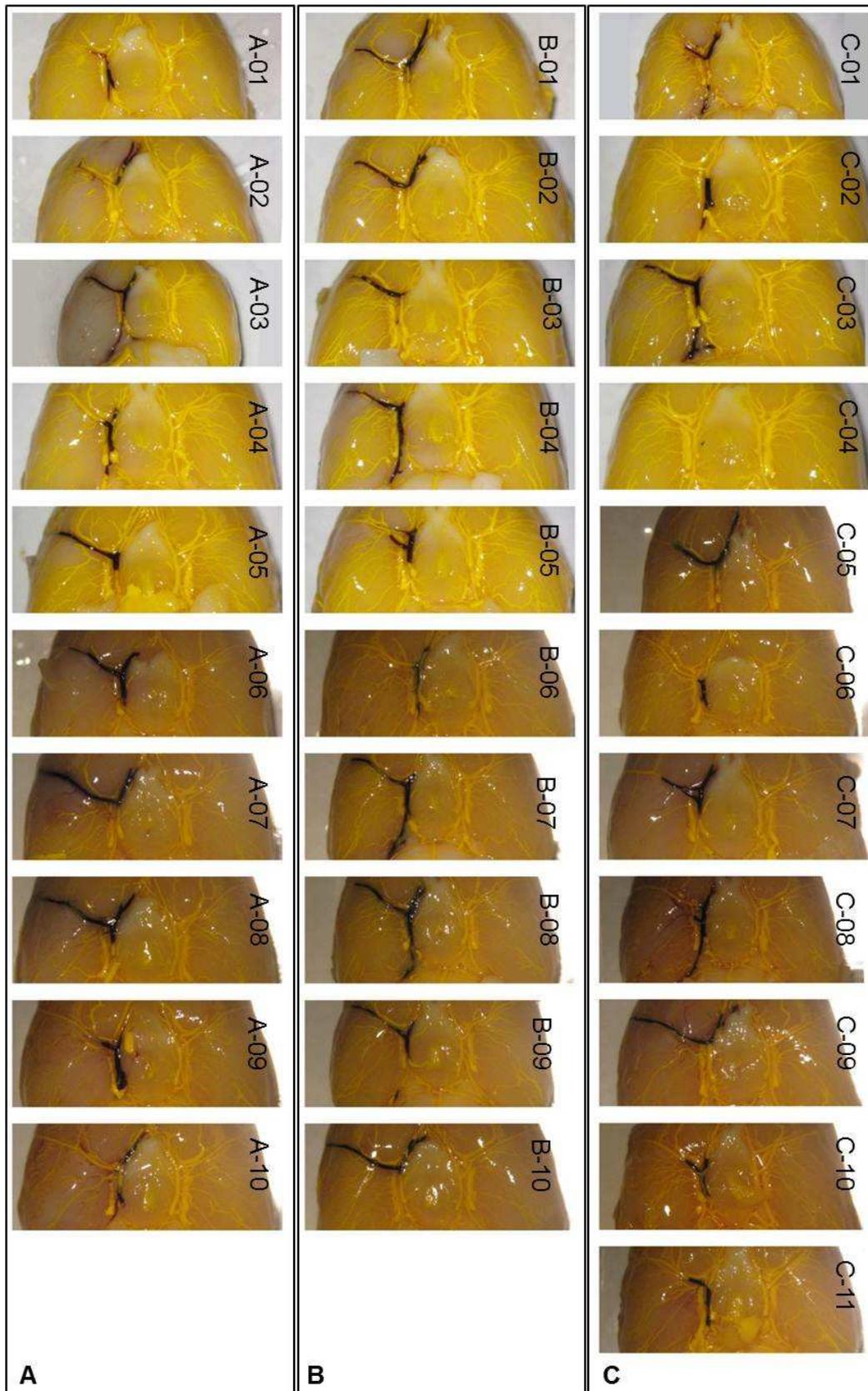


Abb. 4-7: Blick von basal auf den mit Microfil® gefüllten Circulus arteriosus cerebri (Willisii) der 31 Studientiere; der mit Evans Blau gefärbte PRP-Thrombus ist bei jedem Tier außer C-04 gut zu erkennen (A: Kontrollgruppe, B: rt-PA-Gruppe, C: BR38-Gruppe)



Abb. 4-8: Blick auf die linke und die rechte Hemisphäre von jeweils lateral. Die mit Microfil® gefüllten zerebralen Gefäße der 31 Studientiere sind gut zu erkennen, ungefähr mittig verläuft die ACM; der mit Evans Blau gefärbte PRP-Thrombus liegt bei einigen Tieren tief distal in der ACM, bei einigen Tieren ist er nicht zu sehen (A: Kontrollgruppe, B: rt-PA-Gruppe, C: BR38-Gruppe)

3. Experiment III: Einfluss der Bläschengröße bei zerebralen Luftmikroembolisationen

3.1 Gruppenbesetzung

Gruppe	Bezeichnung	Gruppengröße
A	Sham-operiert	5
B	Kleine Bläschen	6
C	Große Bläschen	5

Tab. 4-10: Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen in Experiment III

Für Experiment III wurden insgesamt 20 WU operiert. Zwei Tiere aus Gruppe C konnten aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht in die Studie aufgenommen werden.

Bei Ausschlusstier 1 wurden 1815 Gasbläschen mit einer durchschnittlichen Größe von 47,5 µm innerhalb einer Zeit von 1 min 55 sec eingeleitet. Damit bestand eigentlich kein Grund zum Studienausschluss (siehe Abbruch- und Ausschlusskriterien, Kapitel 2.3.4 im Teil Material und Methoden). Bei der Analyse der Computeraufzeichnungen zeigte sich allerdings, dass etwa 180 Bläschen (10% aller Gasbläschen) eine Größe von ungefähr 90 µm hatten.

Während der Gasbläscheneinleitung von Ausschlusstier 2 kam es von technischer Seite zu Strömungsproblemen. Diese erhöhten die Gasbläscheneinleitungszeit auf 3 min 18 sec (Volumen an Spüllösung auf 1,11 ml), womit die für den Studieneinschluss vorgegebene maximale Zeitdauer von 2 min 30 sec um 48 sec überschritten war.

Ein Tier aus Gruppe A zeigte während der Operation starke Blutdruckschwankungen (arterieller Blutdruck zwischen 72 und 172 mmHg) und hatte vermehrt Atemstillstände, aufgrund denen es letztlich auch noch während der Operation verstarb (Komplikationsrate: 15%).

Ein weiteres Tier aus Gruppe C ist etwa 5 h nach Einleitung der Gasbläschen verstorben (siehe Kapitel 3.4), so dass letztlich 16 Tiere für die Auswertung zur Verfügung stehen (Tab. 4-10).

3.2 Physiologische Parameter

Die Körpertemperatur, der arterielle Blutdruck und die mittels Blutgasanalyse bestimmten Parameter befanden sich bei sämtlichen in der Studie eingeschlossenen Tieren zu allen Messzeitpunkten im physiologischen Bereich. Zwischen den Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p > 0,05$).

3.3 Luftbläscheneinleitung

Gruppe		A		B		C	
		Sham-operiert		Kleine Bläschen		Große Bläschen	
Bläschenzahl (soll)	Bläschenzahl (ist)	-	-	1800	$1808,5 \pm 11,0$	40	$40,2 \pm 0,4$
	Abweichung				0,5%		0,05%
Bläschengröße (soll)	Bläschengröße (ist) [μm]	-	-	45	$45,8 \pm 2,8$	160	$159,0 \pm 1,3$
	Abweichung				1,8%		0,6%

Tab. 4-11: Parameter der Luftbläscheneinleitung

In Tab. 4-11 finden sich die tatsächlich im Experiment vorgekommenen Bläschenzahlen und -größen im Vergleich zu den für die jeweiligen Gruppen geplanten Parametern. Die Einleitungszeit lag mit dem durchschnittlichen Wert von $1 \text{ min } 57 \text{ sec} \pm 12 \text{ sec}$ deutlich unter den geplanten $2 \text{ min } 30 \text{ sec}$. Im Mittel erhielten damit die WU $0,65 \text{ ml} \pm 0,1 \text{ ml}$ an Spüllösung injiziert.

3.4 Mortalitätsrate

Aus der Gruppe mit den großen Bläschen (C) ist 5 h 30 min nach der Operation ein Tier verstorben. Im 4 h-Neuroscore erzielte dieses Tier 20 Punkte, auf dem Rotarod wurden 4 h nach dem Eingriff 0 rpm notiert. Die anschließende Sektion ergab keine Auffälligkeiten.

Damit beträgt die Mortalitätsrate für das gesamte Experiment (rechnet man mit 17 operierten und aus der Narkose erwachten Tieren) 5,9%.

3.5 Klinisch-neurologische Untersuchungen

Die Untersuchungen vor den Eingriffen ergaben bei allen Tieren 0 Punkte. Sämtliche Tiere aus der Sham-Gruppe waren zu den Untersuchungszeitpunkten nach dem Eingriff ebenfalls klinisch-neurologisch unauffällig (0 Punkte). Die erreichten Punktzahlen zum 4 h- und 24 h-Untersuchungszeitpunkt der Tiere aus den Gruppen B und C finden sich in Tab. 4-12 und sind grafisch dargestellt in Abb. 4-9.

Gruppe	Bezeichnung	Neuroscore		Rotarod		
		4 h	24 h	Baseline	4 h	24 h
A	Sham-operiert	0	0	24 ± 4,2	18 ± 12	22 ± 8
B	Kleine Bläschen	15 ± 11,8	10 ± 5,5	23 ± 4,5	21 ± 7,3	21 ± 7,3
C	Große Bläschen	19,2 ± 11,1	19 ± 10,2	22 ± 3,1	19 ± 11	20 ± 10,9

Tab. 4-12: Neuroscore und Rotarod-Laufleistungen in Experiment III

Vergleicht man die beiden Gasbläschen-Gruppen mit der Sham-operierten Gruppe, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Neuroscore ($p < 0,05$; post-hoc Analyse mit dem Mann-Whitney-U-Test (MWU)). Im direkten Vergleich von Gruppe B mit Gruppe C zeigen sich weder bei den Untersuchungen nach 4 h ($p = 0,93$; MWU), noch nach 24 h ($p = 0,18$; MWU) signifikante Unterschiede ($p > 0,05$).

Die Laufleistung auf dem Rotarod wurde in allen Gruppen nach der Gasbläscheneinleitung schlechter (Tab. 4-12 und Abb. 4-9). Es gab zu keinem der Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p > 0,05$ mit MWU) (Tab. 4-13).

Signifikanzniveau Rotarod-Laufleistung		4 h	24 h
A vs. B	Sham-operiert vs. Kleine Bläschen	0,79	0,93
A vs. C	Sham-operiert vs. Große Bläschen	0,69	0,84
B vs. C	Kleine Bläschen vs. Große Bläschen	0,79	0,93

Tab. 4-13: Signifikanzniveau p in der post-hoc Analyse mit dem Mann-Whitney-U-Test bei der Rotarod-Laufleistung nach 4 h und 24 h der Gruppen im Vergleich (vs.: versus)

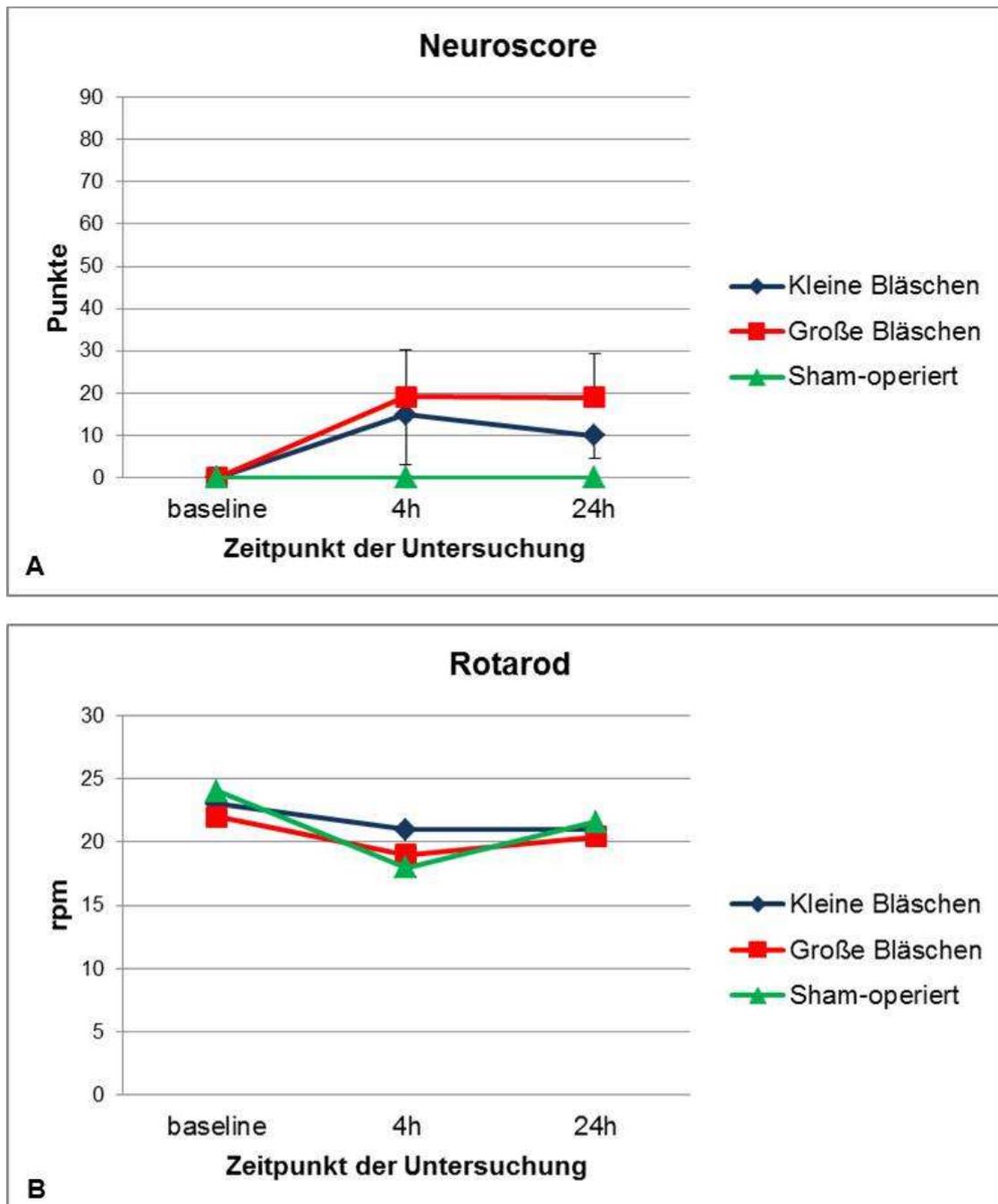


Abb. 4-9: Verlauf des Neuroscores (A) und der Rotarod-Laufleistungen (B) in Experiment III

Auffällig ist jedoch, dass es sowohl in Gruppe B als auch in Gruppe C jeweils ein Tier gab, das ohne korrespondierenden Infarktbereich im MRT Auffälligkeiten im Neuroscore zeigte. Das Tier aus der Gruppe B wurde nach 4 h mit 20, nach 24 h mit 10 Punkten bewertet. Seine Laufleistung stieg von 18 rpm (Baseline) auf 24 rpm (4 h) und schließlich 30 rpm (24 h) an. Das Tier aus der Gruppe C hatte sowohl bei der 4 h als auch bei der 24 h-Untersuchung jeweils 20 Punkte im Neuroscore. Seine Laufleistung stieg ebenfalls von 24 rpm (Baseline) auf 30 rpm (4 h und 24 h) an.

3.6 Auswertung der MRT-Bilder

Die Sham-operierten Tiere zeigten im MRT 24 h nach ihrer Operation alle einen unauffälligen zerebralen Befund. Aus den Gasbläschengruppen konnte bei jeweils vier Tieren ein ischämischer Hirninfarkt mit korrespondierenden Veränderungen im apparenten Diffusionskoeffizienten (ADC; zytotoxisches Ödem) und der T2-Relaxationszeit (vasogenes Ödem) gefunden werden. In Gruppe B (kleine Bläschen) und C (große Bläschen) hatten damit 66,67% aller Tiere einen Infarkt.

Im Vergleich der Gasbläschengruppen zur Sham-Gruppe zeigten sich jeweils signifikante Unterschiede in diesen Werten ($p < 0,05$). Beim Vergleich der Gasbläschengruppen untereinander konnte jedoch keine Signifikanz in den Ödemwerten (ADC-Abfall und Anstieg der T2-Relaxationszeit; Ausprägung der Mittellinienverlagerung) und den Läsionsgrößen gefunden werden ($p > 0,05$).

3.6.1 ADC und T2-Relaxationszeit

Die Kontrollgruppe zeigte weder einen Abfall des ADC, noch eine Zunahme der T2-Relaxationszeit.

In der Gruppe mit den kleinen Gasbläschen kam es bei den vier Tieren mit Infarkt zu einem ADC-Abfall von $-9,6 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{sec} \pm 6,2$. Die kortikalen Werte lagen dabei zwischen $-2,3$ und $-27,2 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{sec}$ (Mittelwert: $-17,7 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{sec} \pm 13,4$) und subkortikal zwischen $-1,8$ und $-17 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{sec}$ (Mittelwert: $-8,1 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{sec} \pm 7,9$). Die T2-Relaxationszeit stieg insgesamt um $15,4 \text{ msec} \pm 13,1$ an. Kortikal lag der Anstieg zwischen 4 und $55,7 \text{ msec}$ (Mittelwert: $33,6 \text{ msec} \pm 26,6$) und subkortikal zwischen $2,2$ und $14,2 \text{ msec}$ (Mittelwert: $7,6 \text{ msec} \pm 6,1$).

Die vier Tiere mit ischämischem Infarkt in der Gruppe mit den großen Bläschen hatten einen Gesamt-ADC-Abfall von $-4,4 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{sec} \pm 4,1$. Kortikal fiel der ADC zwischen $-1,2$ und $-12 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{sec}$ (Mittelwert: $-6,6 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{sec} \pm 7,7$), subkortikal zwischen $-0,3$ und $-10,5 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{sec}$ (Mittelwert: $-5,5 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{sec} \pm 4,3$). Die T2-Relaxationszeit stieg um $11,9 \text{ msec} \pm 8,7$ an. Kortikal betrug der Anstieg zwischen $10,8$ und $31,5 \text{ msec}$ (Mittelwert: $21,2 \text{ msec} \pm 14,6$), subkortikal zwischen $1,8$ und $26,2 \text{ msec}$ ($13,1 \text{ msec} \pm 11$).

3.6.2 Mittellinienverlagerung

In der Kontrollgruppe kam es zu keiner Mittellinienverlagerung (MLS).

Die Mittellinie hatte sich in der Gruppe mit den kleinen Bläschen zwischen 1,2 und 5,9 mm (Mittelwert: 3,3 mm \pm 2,4), in der Gruppe mit den großen Bläschen zwischen 1,8 und 5,5 mm (Mittelwert: 3,4 mm \pm 1,9) in Richtung linker Hemisphäre verlagert. Zwischen den beiden Gruppen zeigt sich damit kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) (Abb. 4-10).

3.6.3 Läsionsvolumina in der T2-Bildgebung

In Gruppe B (kleine Bläschen) betrug das prozentuale ödemkorrigierte Läsionsvolumen (%HLV_{ec}) zwischen 0,5 und 19,7% (Mittelwert: 5,2% \pm 8,9%), in Gruppe C (große Bläschen) lag es zwischen 0,2 und 8,2% (Mittelwert: 2,5% \pm 3,7%) (Abb. 4-10). Das Signifikanzniveau lag bei $p = 0,93$ (MWU) (keine statistische Signifikanz).

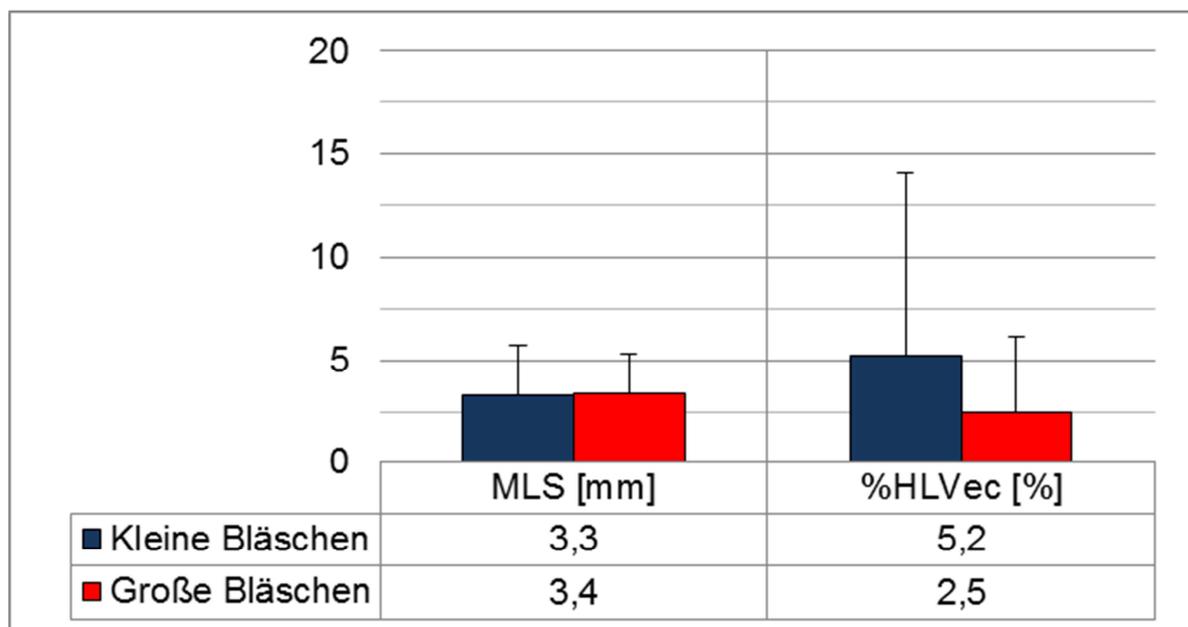


Abb. 4-10: Mittellinienverlagerung (MLS) und prozentuales ödemkorrigiertes Läsionsvolumen (%HLV_{ec}) der Gruppen B (Kleine Bläschen) und C (Große Bläschen)

V Diskussion

1. Mikrobläschenverstärkte Sonothrombolyse

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit des Mikrobläschenpräparates BR38 in zwei verschiedenen Schlaganfallmodellen (mikro- und makrovaskulär) experimentell zu untersuchen. Als Erfolgskontrolle kam zusätzlich das bereits als wirksam die Sonothrombolyse verstärkende getestete BR1 (SonoVue®) (Nedermann et al., 2010; Perren et al., 2008) im mikrovaskulären Modell zum Einsatz.

BR1 und BR38 wurden in zwei unterschiedlichen Dosierungen getestet: die volle Dosis BR1 entsprach dabei der in einer früheren Studie der Arbeitsgruppe bereits als wirksam getesteten Dosis (Nedermann et al., 2010). Die andere gewählte Dosis entsprach einem Drittel der vollen Dosis, um etwaige Dosiseinsparungen der Mikrobläschenpräparate zu evaluieren. Da die Suspensionen beider Präparate dieselbe Anzahl an Mikrobläschen (4×10^8) enthielten, entsprach die volle und die Dritteldosis BR38 der jeweiligen für BR1.

Weiterhin liefen parallel zu den Ultraschallgruppen zwei Gruppen ohne Ultraschalltherapie im Experiment mit: die Gruppe der Kontrolltiere, die nur isotone Kochsalzlösung appliziert bekamen und keine Ultraschallbehandlung erfuhren und eine Lysegruppe, in der die Tiere lediglich rt-PA ohne die Ultraschalltherapie erhielten (entsprechend der Zulassungskriterien zur Lysetherapie humaner Schlaganfallpatienten).

Zur Untersuchung der zerebralen Durchblutung wurde während des Experimentes mittels Laser-Doppler-Messungen der rCBF *in vivo* bestimmt. Postmortal wurden schließlich bei den Gehirnen des mikrovaskulären Versuchs per Mikro-CT die zerebralen Gefäßvolumina ermittelt und im Seitenvergleich „gesunde Hemisphäre – Hemisphäre mit ischämischem Infarkt“ untersucht. Bei den Gehirnen des makrovaskulären Experimentes wurde der Rekanalisierungsgrad postmortal makroskopisch ermittelt.

Für die Sicherheitsevaluation wurden alle Gehirne schließlich noch makroskopisch auf Blutungen untersucht.

1.1 Schlussfolgerungen aus dem mikrovaskulären Fadenmodell

1.1.1 Modellwahl

Das für Experiment I gewählte, mikrovaskuläre Ischämie-Reperfuisionsmodell nach Koizumi et al. (1986) eignet sich hervorragend, im Tierversuch das „No Reflow“-Phänomen (Dawson et al., 1997; Okada et al., 1994) zu untersuchen und mögliche Therapien daran zu evaluieren. Dies konnte auch schon die vorhergehende tierexperimentelle Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit von SonoVue® bei unterschiedlichen Ultraschalleinstellungen zeigen (Nedelmann et al., 2010).

Trotz der Wiederherstellung des Blutflusses nach 90 min Ischämie hatten die Wistar-Unilever-Ratten (WU) der Kontrollgruppe dieses Experimentes auf der ischämischen Seite rechts ein signifikant verringertes zerebrales Gefäßvolumen im Vergleich zur gesunden linken Hemisphäre. Zwar blieb die rechte A. carotis communis (ACC) mit dem Fadenmodell nach Koizumi et al. (1986) permanent verschlossen, aus anderen Studien weiß man jedoch, dass sich der zerebrale Blutfluss der meisten Rattenstämme (darunter auch die in der Schlaganfallforschung verwendeten Stämme) nach Verschluss einer ACC aufgrund der ausgeprägten zerebralen Kollateralversorgung innerhalb weniger Minuten normalisiert (Coyle und Panzenbeck, 1990; De Ley et al., 1985). Die vorhandene Diskrepanz zwischen den zerebralen Gefäßvolumina ist also durch das „No Reflow“-Phänomen der Mikrozirkulation der rechten Hemisphäre bedingt.

Die Hauptversorgung des Circulus arteriosus cerebri (Willisii) erfolgt bei der Ratte wie auch beim Menschen aus der rechten und linken A. carotis interna (ACI) sowie den beiden Arteriae (Aa.) vertebrales, die sich zur A. basilaris zusammenschließen. Die Verbindung zwischen der ACI und der A. basilaris wird beidseits via A. cerebri posterior und A. communicans posterior hergestellt (Casals et al., 2011). Bei Ratten ist zum einen die ACI beidseits fester Bestandteil des Circulus arteriosus cerebri (Willisii), zum anderen ist die A. cerebri anterior/rostralis (ACA) auf beiden Seiten vorhanden und trägt zur ausgeprägten Kollateralversorgung bei. Im Vergleich dazu ist die ACA beim Menschen auf der einen oder manchmal sogar auf beiden Seiten unterentwickelt, stattdessen existiert hier die bei der Ratte fehlende

A. communicans anterior (Lee, 1995). Beim Menschen gibt es eine Vielzahl an anatomischen Varianten in der zerebralen Kollateralversorgung. 50% davon betreffen den Circulus arteriosus cerebri (Willisii), was sich in den individuell unterschiedlichen Auswirkungen eines Gefäßverschlusses der zerebralen Versorgung zeigt (Romero et al., 2009; Liebeskind, 2003).

Die mögliche Variabilität der zerebralen Kollateralversorgung wird durch den hohen Inzuchtgrad des für das Versuchsvorhabens gewählten Rattenstamm (WU) jedoch in engen Grenzen gehalten. Jedoch gibt es auch zwischen den für die Schlaganfallforschung geeigneten Rattenstämmen eine hohe Variabilität bezüglich der Empfänglichkeiten für die unterschiedlichen Auswirkungen der zerebralen Ischämie (Walberer et al., 2006). Dies muss vor Beginn eines Versuches in der experimentellen Schlaganfallforschung unbedingt berücksichtigt werden, um zum einen die Ergebnisse mit anderen Studien vergleichbar zu machen und um zum anderen die Konsequenzen daraus für die klinische Forschung richtig zu interpretieren.

Die Vielzahl an Risikofaktoren, die beim menschlichen Schlaganfallpatienten zum Tragen kommen, wird von den genetisch ähnlichen, jungen, gesunden, männlichen und standardisiert gehaltenen WU selbstverständlich nicht widergespiegelt. Durch die Standardisierung lässt sich aber beispielsweise die prinzipielle Wirksamkeit eines Medikamentes evaluieren (wie im vorliegenden Fall die der Mikrobläschenpräparate in Kombination mit der Sonothrombolyse), um daraus dann unter Berücksichtigung der genannten Faktoren Rückschlüssen für die klinische Forschung zu ziehen.

1.1.2 Wiederherstellung des zerebralen Gefäßvolumens nach ischämischem Schlaganfall

1.1.2.1 Wirksamkeit des Mikrobäschenpräparates BR1

Im vorliegenden Experiment I ließen sich zunächst die Ergebnisse der vorhergehenden Studie mit der vollen Dosis BR1 (Nedermann et al., 2010) reproduzieren. Bei den Tieren dieser Studiengruppe konnten 79% der Gefäße der rechten Hemisphäre rekanalisiert werden.

BR1 ist als SonoVue® in der Neurosonografie bereits zugelassen (Droste, 2008), daher ist es als Verstärker der Sonothrombolyse für die klinische Forschung interessant und sollte (wieder) vermehrt in den Fokus rücken. Die zwei klinischen Studien, die bereits mit SonoVue® zur Verstärkung der Sonothrombolyse durchgeführt worden sind, hatten ihr Hauptaugenmerk jedoch auf der Rekanalisierung großer Gefäßverschlüsse. Perren und Mitarbeiter (2008) konnten im Patientenkollektiv keine unerwünschten Effekte feststellen und verzeichneten eine signifikant verbesserte frühe Reperfusion im Vergleich zur reinen Sonothrombolysegruppe. Larrue und Mitarbeiter (2007) entdeckten jedoch in der MUST-Studie ein erhöhtes Vorkommen von asymptomatischen hämorrhagischen Transformationen und brachen deshalb die Studie ab. Zu symptomatischen Blutungen ist es jedoch bei keinem der Patienten gekommen.

Die in der MUST-Studie festgestellten hämorrhagischen Transformationen konnten jedoch von anderen Studiengruppen in Zusammenhang mit erfolgreichen Rekanalisierungen gebracht werden (Dinia et al. 2009; Molina et al., 2002). Es bleibt daher abzuwarten, ob sich in den noch durchzuführenden histologischen Untersuchungen bei den vorliegenden Gehirnen dieser Zusammenhang ebenfalls feststellen lässt, womit sich die Vermutungen von Nedermann (2010) bestätigen ließen. Die makroskopische Untersuchung der Gehirne ergab jedenfalls keine Hinweise auf Blutungen, weder in den mit Ultraschall behandelten Gruppen, noch in der Kontroll- und rt-PA-Gruppe.

BR1 zeigte sich auch in geringerer Dosierung wirksam. Das zerebrale Gefäßvolumen der Tiere dieser Gruppe war im Mittel zu 80% rekanalisiert. Für potentielle klinische Studien kann daher auch die Dosierung mit SonoVue® geringfügig reduziert werden, was die Sicherheit der SonoVue®-verstärkten Sonothrombolyse weiter erhöht.

Denn wenn weniger Mikrobläschen für die volle Rekanalisierung benötigt werden, dann werden dementsprechend auch die durch die Mikrobläschen verursachten, möglichen schädlichen Effekte geringer. Mikrobläschen verstärken durch ihr Schwingungsverhalten und die entstehenden „Microjets“ und „Microstreams“ die Wirkung des Ultraschalles (Mearns et al., 2012), können damit aber auch zu einer potentiellen Gefahr für die Blutgefäße werden und diese wie auch die Oberfläche von Gerinnseln beschädigen. Jedoch scheint die Beschädigung und Auflösung des Thrombus vor möglichen Beschädigungen der Endothelzellen zu kommen, so dass mit Defekten am Endothel vermutlich erst bei massivem Vorkommen von Mikrobläschen zu rechnen ist. Um mögliche, durch schwingende Mikrobläschen verursachte Endotheldefekte dennoch sicher ausschließen zu können, sollte man die Gehirne zusätzlich zur histologischen Untersuchung auch noch immunhistochemisch mit Markern für das Endothel- und die Blut-Hirn-Schranke untersuchen.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass das Mikrobläschenpräparat BR1 gute bis sehr gute Rekanalisierungsraten (79% volle Dosis, 80% Dritteldosis) im mikrovaskulären Modell erzielt und sich damit als Therapieoption zur Wiederherstellung der Mikrozirkulation nach rekanalisierender Thrombolyse eines größeren Gefäßverschlusses anbietet und zur Behandlung primär in den kleinen Gefäßen lokalisierter Thromben eignet.

1.1.2.2 *Wirksamkeit des Mikrobläschenpräparates BR38*

Das neue Mikrobläschenpräparat BR38 zeigte ebenfalls in beiden gewählten Dosierungen seine Wirksamkeit in der Verstärkung der Sonothrombolyse und sorgte für die gute bis sehr gute Rekanalisierung der zerebralen Gefäße der rechten Hemisphäre.

In voller Dosis übertrifft es in seiner Wirksamkeit das Gesamtgefäßvolumen betreffend mit einer Rekanalisierungsrate von 84% möglicherweise die Wirksamkeit beider Dosierungen von BR1 (volle Dosis: 79%; Dritteldosis: 80%), wobei diese Unterschiede zu BR1 nicht signifikant waren. In der Gruppe mit reduzierter Dosis BR38 (Gruppe D) lag die Gesamtrekanalisierungsrate bei 75% und hat damit im Trend eher eine geringere Rekanalisierungsrate.

Auch beim Präparat BR38 besteht damit prinzipiell eine sehr gute Wirksamkeit auf die Rekanalisierung der zerebralen Gefäße im mikrovaskulären Modell. Daher kommt es ebenfalls wie BR1 als mögliche Option zur Therapie des „No Reflow“-Phänomens zur Wiederherstellung der Mikrozirkulation und zur Behandlung primärer Verschlüsse in kleineren zerebralen Gefäßen in Frage.

Eine aus Sicherheitsgründen nötige Dosisreduktion ist zwar möglich, jedoch sollte beim Präparat BR38 bedacht werden, dass sich im Tierversuch geringfügig schlechtere Rekanalisierungsraten in der Dritteldosis im Vergleich zur vollen Dosis ergeben haben. Widerspricht nichts gegen den Einsatz der vollen Dosis am Patienten, so sollte diese bei BR38 auch in klinischen Studien zum Einsatz kommen.

Die erste klinische Phase I-Studie am Menschen ist für BR38 im Zuge der Sicherheitsüberprüfungen für den Einsatz in der Diagnostik als Echokontrastverstärker bereits abgeschlossen (Schneider et al., 2011). Daher rückt auch dieses Präparat in das Interesse für klinische Studien zur Sonothrombolyse und zur Therapie des „No Reflow“-Phänomens. Jedoch sollte hier ebenfalls noch die anstehende histologische Untersuchung auf Hämorrhagien und atypische hämorrhagische Transformationen abgewartet werden. Zusätzlich könnten hier wie auch schon für die Gehirne der BR1-Gruppen immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt werden.

1.1.2.3 *Ist die Wirksamkeit der Mikrobäschenpräparate auf bestimmte zerebrale Gefäßanteile beschränkt?*

Der Blick auf die Tiere der rt-PA- und Kontrollgruppe ergibt zunächst, dass in beiden Gruppen das totale Gefäßvolumen rechts signifikant geringer ist als links (Rekanalisierungsrate Kontrollgruppe 58%; rt-PA-Gruppe 60%). Dieses schlechte Ergebnis scheint vor allem durch die striatalen Gefäße bedingt sein. So ist beispielsweise das absolute Gefäßvolumen im Kortex der Kontrollgruppe rechts nicht signifikant geringer als links und auch in der rt-PA-Gruppe liegt das Signifikanzniveau p hier grenzwertig bei exakt 0,05.

Hier stellt sich daher die Frage, ob die Mikrobäschenpräparate vor allem auf die striatale Mikrozirkulation wirken.

Zunächst ist in der vollen Dosisgruppe BR38 (Gruppe C) auffällig, dass hier das absolute Gefäßvolumen des rechten Kortex signifikant kleiner ist im Vergleich zum linken. Die gute Wirksamkeit der vollen Dosis BR38 auf das totale Gefäßvolumen (84% Rekanalisierungsrate) scheint also auf seiner sehr guten Wirkung auf die striatale Mikrozirkulation zu beruhen.

Ob sich daraus auf eine bessere Wirksamkeit von BR38 auf die Gefäße des Striatum schließen lässt, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend geklärt werden. Weitere Experimente werden nötig sein, um diesen Sachverhalt endgültig zu klären.

In der Dritteldosisgruppe BR38 konnte dieser Unterschied zwischen kortikalem und striatalem Gefäßvolumen jedenfalls nicht festgestellt werden. Die Rekanalisierungsrate war im Kortex und Striatum ähnlich, die absoluten Gefäßvolumina der rechten Hemisphäre sind in dieser Studiengruppe nicht signifikant schlechter als die der gesunden Seite.

In den beiden BR1-Dosisgruppen ist die Durchblutung der striatalen Gefäße rechts nicht signifikant schlechter als links. In der vollen Dosisgruppe beträgt die Differenz der Gefäßvolumina $0,2 \text{ mm}^3$, in der Dritteldosisgruppe $0,21 \text{ mm}^3$.

Besonders ausgeprägt scheint die Wirkung dieses Mikrobäschenpräparates aber auf die kortikalen Gefäßanteile zu sein. Die durchschnittlichen Gefäßvolumina des rechten und linken Kortex unterscheiden sich nur noch minimal. In der vollen

Dosisgruppe besteht eine Differenz von 0,01 mm³, in der Dritteldosisgruppe eine Differenz von 0,03 mm³ im absoluten Gefäßvolumen des Kortex. Fast alle kortikalen Gefäße sind in den BR1-Gruppen somit rekanalisiert.

Auch hier stellt sich die Frage, ob das Präparat BR1 im Zusammenhang mit der Sonothrombolyse neben einer allgemein guten Rekanalisierungsrate eine besonders ausgeprägte Wirksamkeit auf die kortikalen Gefäße hat. Abschließend lässt sich der Fall aber mit den vorliegenden Ergebnissen jedoch nicht beantworten, auch hier sind weitere Studien nötig. Möglicherweise könnten sich beide Mikrobläschenpräparate beim gleichzeitigen Einsatz in der Sonothrombolyse auch in ihrer Wirkung sinnvoll ergänzen.

1.1.2.4 *Wirksamkeit des Fibrinolytikums rt-PA*

Die einzige, in Deutschland seit dem Jahr 2000 zugelassene Therapieoption zur Behandlung eines ischämischen Schlaganfalles ist die intravenöse Thrombolysetherapie mit dem Fibrinolytikum rt-PA, die innerhalb von 4,5 Stunden nach eingetretenem Gefäßverschluss erfolgen muss, um noch erfolgreich zu sein (Hacke et al., 1995, 1998, 2004 und 2008; Clark et al., 1999). Es gibt vereinzelt Hinweise darauf, dass dieses Zeitfenster bei ausgewählten Patienten (Wunderlich et al., 2007) und bei intraarterieller rt-PA-Gabe (Furlan et al., 1999) größer ist. Die Möglichkeiten, eine derartige Selektion bei den Patienten durchzuführen, sind in den meisten Krankenhäusern jedoch stark beschränkt. In Deutschland werden mit der rt-PA-Monotherapie aufgrund des beschränkten Zeitfensters und aufgrund häufiger Kontraindikationen von Seiten des Patienten daher nur 7 bis 10% aller Schlaganfallpatienten behandelt (Heuschmann et al., 2010). Nur jeder siebte Patient, der mit rt-PA lysiert wurde, übersteht seinen Schlaganfall ohne alltagsrelevante Behinderung (Hacke et al., 2004).

Im Experiment I erfolgte die intravenöse thrombolytische Therapie innerhalb des vorgegebenen Zeitfensters (Beginn etwas über 90 min nach Okklusion; Dauer: 60 min). Dennoch hatte die rt-PA-Gruppe in der rechten Hemisphäre ein signifikant schlechteres Gefäßvolumen als links. Die Rekanalisierungsrate lag bei lediglich 60%.

Daher scheint sich die thrombolytische Wirksamkeit des rt-PA zumindest im Kontext der hier durchgeführten Experimente nicht auf die mikrovaskuläre Zirkulation des Gehirns zu erstrecken. Die durch das „No Reflow“-Phänomen bedingte Störung der Mikrozirkulation kann mit der rt-PA-Monotherapie nicht adäquat behandelt werden, was vielleicht auch die eingeschränkte Wirksamkeit im humanen Patienten und das zeitlich enge Therapiefenster erklärt.

1.1.2.5 *Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen*

Interessant in vielerlei Hinsicht ist auch noch der Blick auf die Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen, obwohl hier lediglich eine Signifikanz zwischen den Baseline-Werten und allen nachfolgenden Werten festzustellen war und zwischen den Verlaufsmessungen keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt werden konnten.

Die Messungen des rCBF dienten zunächst der Überprüfung des Operationserfolges und beantworteten mit einem Abfall des rCBF-Wertes post Okklusion auf oder unter 80% des Baseline-Wertes die Frage, ob das Okkluderköpfchen den Abgang der ACM tatsächlich sicher verschloss (Woitzik und Schilling, 2002). Ein Nichterreichen dieses Wertes führte zum Studienausschluss des betreffenden Tieres.

Aufgrund der eigenen Erfahrung aus anderen Studien mit dem Fadenmodell und einer Vorstudie zum vorliegenden Experiment kann tatsächlich davon ausgegangen werden, dass bei allen Studientieren die ACM sicher verschlossen war, wenn der vorgegebene Abfall des rCBF post Okklusion verzeichnet wurde. Um diese Aussage zu überprüfen, sollten jedoch zusätzlich bei den histologischen Untersuchungen zur Sicherheitsevaluation noch die Infarktgrößen bestimmt werden.

Setzt man die rCBF-Werte vor der Therapie (Messzeitpunkt post Reperfusion) auf 100%, ergibt sich interessanterweise, dass sich der rCBF der Gruppen A (Kontrolle) und D (Dritteldosis BR38) nach der Therapie um über 20% (Gruppe A: 28%; Gruppe D: 23%) gesteigert hat. Eine Steigerung des rCBF zeigt sich auch in den BR1-Gruppen (Dritteldosis um 14%, volle Dosis um 6%). Schlechtere Werte zeigen die Gruppe rt-PA (-10%) und die Gruppe mit der vollen Dosis BR38 (-4%). Diese Veränderungen im rCBF waren jedoch alle nicht signifikant ($p > 0,05$).

Betrachtet man diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den mittels Mikro-CT ermittelten, absoluten kortikalen Gefäßvolumina, so zeigt sich, dass gerade in den beiden Gruppen, in denen sich der rCBF post Therapie verschlechtert hat, auch das Gefäßvolumen rechts (signifikant) geringer war als links (volle Dosis BR38: $p < 0,05$; rt-PA: $p = 0,05$).

Prinzipiell lässt sich aufgrund der Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen sagen, dass sich diese Methode nicht eignet, um die Fragestellung der vorliegenden Arbeit zu klären. Die Rekanalisierung der mikrovaskulären Gefäße kann damit nicht detektiert, geschweige denn quantifiziert werden. Derzeit kommerziell erhältliche Geräte für die Laser-Doppler-Messungen wie auch das genutzte Gerät haben bei der Messung des rCBF lediglich eine Eindringtiefe von 100 bis 400 μm (Fukuda et al., 1995). Damit können also tatsächlich nur oberflächliche, kortikale Gefäße erfasst werden.

Dies mag ein Grund für den Zusammenhang der Laser-Doppler- und kortikalen Mikro-CT-Ergebnissen der Gruppen B (rt-PA) und C (volle Dosis BR38) sein. Da der Kortex jedoch auch in der Tiefe von Gefäßen durchzogen ist und der mittels Laser-Doppler-Untersuchung erfasste Anteil viel zu oberflächlich ist, mag der gefundene Zusammenhang auch Zufall sein. Selbstverständlich könnten aber auch gerade in diesen Gruppen die oberflächlichen Gefäße des Kortex nicht rekanalisiert gewesen sein. Diese Frage ließe sich vielleicht auch über die histologische Untersuchung der Gehirne klären.

1.1.3 Sicherheitsevaluation

Die makroskopische Untersuchung der Gehirne aller Studientiere ergab keine Blutungen. Um dennoch auch kleinste Gefäßschäden mit nachfolgendem Blutaustritt sichtbar zu machen, sollten die Gehirne histologisch untersucht werden. Dabei können auch die bereits erwähnten asymptomatischen hämorrhagischen Transformationen, die vermutlich im Zusammenhang mit der erfolgreichen Rekanalisierung auftreten, detektiert werden.

Zusätzlich sollte auch die Möglichkeit der immunhistochemischen Untersuchungen in Betracht gezogen werden, um die Endothelbeschaffenheit der Mikrozirkulation zu untersuchen. Diese könnte sich aufgrund der Effekte der Mikrobläschen wie beispielsweise der „Microjets“ beeinträchtigt zeigen.

Bei zwei Tieren aus diesem Experiment wurden nach der Gehirnentnahme basal Subarachnoidalblutungen (SAB) festgestellt, was zum Studienausschluss dieser Tiere führte. Da beide Tiere mit Ultraschall behandelt worden sind, muss ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Blutung und der Ultraschalltherapie in Betracht gezogen werden.

Die Laser-Doppler-Messungen dieser Tiere ergaben jedoch bereits zum Messzeitpunkt post Okklusion einen sehr starken Abfall des rCBF (<10% des Baseline-Wertes), was für das Auftreten der SAB zu diesem frühen Zeitpunkt spricht (Bederson et al., 1995). Damit wären sie durch den Okkluder verursacht worden, eine typische Komplikation und einer der Nachteile des Fadenmodells (Gerriets et al., 2003a, b und 2004c; Schmidt-Elsässer et al., 1998; Woitzik und Schilling, 2002). Für diese These spricht zusätzlich zum starken Abfall des rCBF auch die Lage der Blutungen genau am rechten Karotis-T – also genau dort, wo also die Spitze des Okkluders normalerweise zu liegen kommt.

Dennoch sollten auch diese beiden Gehirne noch mittels Histologie auf weitere Blutungen hin untersucht werden.

1.1.4 Resümee und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die getesteten Mikrobläschenpräparate in beiden Dosierungen eine signifikante Verbesserung der Rekanalisierungsrate mikrovaskulärer Gefäßverschlüsse bewirkten. Jedoch sollte die Dosis des Präparates BR38 nur in begründeten Ausnahmefällen wie bei einer befürchteten Erhöhung der unerwünschten Wirkungen reduziert werden.

Makroskopisch konnten für keine der Dosierungen Blutungen festgestellt werden. Die Frage, ob die Präparate BR1 und BR38 nur spezifisch auf die Gefäße einer bestimmten Gehirnregion wirken, lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht

abschließend klären. Es sollte auf jeden Fall noch die histologische Untersuchung auf Hämorrhagien und Infarktgrößen durchgeführt werden. Zusätzlich könnten immunhistologische Untersuchungen auf die Endothelbeschaffenheit durchgeführt und vorhandenes Fibrin und anderes Thrombusmaterial in den Kapillaren und kleineren Gefäßen detektiert werden.

Auch die Untersuchung aller oder ausgewählter Tiere mittels Nano-CT, um tatsächlich auch die kleinsten zerebralen Gefäßstrukturen darzustellen und zu bewerten (Langheinrich et al., 2009), sollte überdacht und in Betracht gezogen werden. Gerade beim „No Reflow“-Phänomen sind winzigste zerebrale Kapillaren von den Obstruktionen betroffen (Dawson et al., 1997; Okada et al., 1994). Diese ließen sich mittels Nano-CT gut darstellen, wie auch schon Nedelmann und Mitarbeiter (2010) in der Studie mit SonoVue® zeigen konnten.

Dass es in keiner der Studiengruppen gelungen war, eine Rekanalisierungsrate von 100% zu erreichen, mag auch an der Applikationsart des Röntgenkontrastmittels liegen. Die rechte ACC blieb aufgrund der Operationstechnik, den Okkluder darüber in Richtung der A. cerebri media (ACM) vorzuschieben, permanent ligiert. Damit erfolgte die Microfil®-Injektion nur über die linke ACC, womit sich logischerweise zunächst die linke, gesunde Hemisphäre besser und schneller mit dem Röntgenkontrastmittel füllte. Zu vermuten wäre also, dass die Rekanalisierungsrate bei allen Tieren (auch den Tieren aus der Kontroll- und der rt-PA-Gruppe) höher liegt als die angegebenen Werte.

1.2 Schlussfolgerungen aus dem makrovaskulären Thrombembolienmodell

1.2.1 Modellwahl

Die Okklusion der ACM wurde in dem hier gewählten makrovaskulären Ischämiemodell mit Thromben aus thrombozytenreichem Plasma (engl. platelet rich plasma, PRP) herbeigeführt, die mittels Katheter direkt in das Karotis-T der Studientiere platziert wurden (DiNapoli et al., 2006). Die Thrombenherstellung erfolgte leicht modifiziert mit der Methode nach Roessler et al. (2011 a und b).

Die Vorteile des Thrombembolienmodelles liegen darin, dass es die Situation des thrombembolisch-ischämischen Schlaganfalles des Menschen stärker widerspiegelt als beispielsweise das in Experiment I verwendete Fadenmodell (Koizumi et al., 1986). Das Fadenmodell wäre für die hier vorliegende Fragestellung nicht geeignet gewesen. In Experiment II sollte die rekanalisierende Wirkung des Mikrobläschenpräparates BR38 in Kombination mit der Sonothrombolyse auf makrovaskuläre Gefäßverschlüsse untersucht werden. Für das mikrovaskuläre Modell aus Experiment I war es vollkommen ausreichend, die ACM mit dem Okkluderköpfchen für 90 min zu verschließen. Es kam zur Bildung von Thromben in der Mikrozirkulation, so dass diese aufgrund des „No Reflow“-Phänomens auch nach der eingeleiteten Reperfusion nicht wieder durchblutet wurde (Nedelmann et al., 2010).

Der Verschluss eines der größeren zerebralen Gefäße beim Menschen wird in den meisten Fällen durch einen Thrombus oder Embolus im Gefäßsystem verursacht (Donnan et al., 2008). Daher muss auch bei der experimentellen Forschung zu thrombolytischen Prozessen die zerebrale Zirkulation betreffend auf ein möglichst „lebensnahes“ Modell zurückgegriffen werden.

In der Literatur findet man eine Vielzahl an Thrombembolienmodellen, ein jedes mit entsprechenden Vor- und Nachteilen. Die Thrombenherstellung reicht von der Spontangerinnung venösen (Zhang et al., 1997) und arteriellen Blutes (DiNapoli et al., 2006) über die Herstellung fibrinreicher Thromben (Busch et al., 1997) und die Verwendung arteriellen Blutes, das zur Gerinnung mit Thrombin vermischt wird

(Wang et al., 2001) bis zur Herstellung von Thromben aus Vollblut, das mit Kalziumchlorid und Thrombin vermennt wird und einem „osmotischen Schock“ ausgesetzt wird (Toomey et al., 2002). Bei der Anwendung der verschiedenen Thrombembolienmodelle *in vivo* wurden jedoch immer wieder Spontanrekannalisierungen beobachtet. Je nach Fragestellung eignen sich demnach mal die „roten“, spontan geronnenen Thromben, mal die „weißen“, Thrombin-induzierten und fibrinreichen Gerinnsel besser für die jeweils entsprechende Studie (Howells et al., 2010).

Das hier vorliegende Experiment sollte der Situation im Menschen möglichst nahe kommen, weshalb zum einen die Wahl auf den Stamm der spontan hypertensiven Ratten (SHR) fiel und zum anderen die doch sehr stabilen PRP-Thromben verwendet wurden. Bei der ersten makroskopischen Beurteilung der Gehirne der Studientiere fiel dementsprechend auch auf, dass bei allen Tieren der mit Evans Blau gefärbte Thrombus mehr oder weniger noch vorhanden war.

1.2.2 Auflösung makrovaskulärer Gefäßverschlüsse

1.2.2.1 Wirksamkeit des Mikrobläschenpräparates BR38

Es war also bei keinem der Tiere gelungen, den PRP-Thrombus komplett aufzulösen. In der basalen Ansicht unterschieden sich die Gruppen nicht sonderlich voneinander. In der Kontroll- und rt-PA-Gruppe war bei allen Tieren der Thrombus vorhanden (100%), in der Mikrobläschengruppe war bei einem Tier kein Thrombus zu erkennen. Bei dem entsprechenden Tier saß dieser tief distal in der ACM und war lateral zu sehen. Lateral zeigten sich in der Mikrobläschengruppe insgesamt weniger Thromben (36% der Tiere) im Vergleich zu den beiden anderen Gruppe (Kontrolle: 60% der Tiere, rt-PA 80% der Tiere).

Das geringere Vorkommen von Thromben insgesamt in der Mikrobläschengruppe lässt vielleicht den Schluss zu, dass BR38 auch im makrovaskulären Modell mit den gewählten, sehr stabilen PRP-Thromben schwache Therapieerfolge in Kombination mit der Sonothrombolyse zeigt. Auffällig ist sicher, dass in dieser Gruppe lateral weniger Thromben vorzufinden waren als bei den Tieren der anderen Gruppen. Ob

dies auch ein Hinweis auf die im Experiment I festgestellte Wirksamkeit auf Verschlüsse kleinerer Arterien ist, lässt sich mit den hier erhobenen Daten nicht abschließend klären. Eine ergänzende Untersuchung im Mikro-CT könnte hier weitere Klärung bringen.

Möglicherweise hätten die festen PRP-Thromben mit einer Verlängerung der Behandlungszeit oder mit anderen als den gewählten Ultraschalleinstellungen effektiver behandelt werden können. Zudem zeigten sich bereits in Experiment I Tendenzen einer verringerten Wirksamkeit des BR38 in der Gruppe mit der Dritteldosis. Möglicherweise wäre es daher auch durch eine Erhöhung der BR38-Dosis zu besseren Behandlungsergebnissen gekommen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können daher als Grundlage dienen, um diese Zusammenhänge in weiterführenden Studien zu untersuchen und für diese Studien exaktere Fallzahlen und Therapieparameter zu definieren.

Die durchgeführte makroskopische Befundung der Gehirne lässt selbstverständlich nur eine oberflächliche Betrachtung zu und ist bei weitem nicht ausreichend zur abschließenden Beurteilung der Wirksamkeit der Sonothrombolyse verstärkenden Eigenschaften des Mikrobläschenpräparates BR38 im makrovaskulären Okklusionsmodell. Daher müssen diese Gehirne ebenfalls noch im Mikro-CT untersucht werden. Erst die Ergebnisse der absoluten und totalen Gefäßvolumina der beiden Hemisphären werden es ermöglichen, dieses Experiment abschließend beurteilen zu können und eine im Rahmen der Versuchsbedingungen sichere Aussage bezüglich der Wirksamkeit von BR38 bei thrombotischen Verschlüssen der großen Gefäße zu treffen.

Aufgrund der Operationsmethode dieses Experimentes, den Thrombus über einen Stumpf der A. carotis externa (ACE) zu applizieren, konnte die Microfil®-Injektion bei den vorliegenden Gehirnen sowohl über die linke, als auch über die rechte ACC erfolgen. Prinzipiell kann also hier von einer guten, beidseitigen Microfil®-Perfusion der Hemisphären ausgegangen werden, was für die noch zu erfolgende Mikro-CT-Untersuchung von Interesse ist. Bei der Beurteilung der Scans kann hier dann also davon ausgegangen werden, dass die Gefäßperfusion mit Microfil® auch das tatsächliche Gefäßvolumen der rechten Hemisphäre widerspiegelt.

1.2.2.2 *Wirksamkeit des Fibrinolytikums rt-PA*

Die Wirksamkeit von rt-PA scheint sich nicht auf die Auflösung der stabilen PRP-Thromben im gewählten Modell zu erstrecken. In der basalen Ansicht war bei der Kontrollgruppe der Thrombus noch bei allen Tieren vorhanden, lateral hatten in der rt-PA-Gruppe 80% der Tiere Thromben, in der Kontrollgruppe war dies bei 60% der Tiere der Fall. In diesen beiden Gruppen zeigt sich besonders deutlich, wie stabil die PRP-Thromben tatsächlich sind. Die Wahrscheinlichkeit für Spontanrekanalisierungen, wie sie oft in anderen Thrombembolienmodellen gesehen werden, ist daher bei diesem Modell vermutlich eher gering.

Die abschließende Beurteilung der möglichen Wirksamkeit der rt-PA-Monotherapie in dem gewählten Modell kann aber letztlich auch erst nach der anschließenden Untersuchung mit dem Mikro-CT erfolgen.

1.2.2.3 *Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen*

Wie bereits aus Experiment I bekannt, eignet sich die Methode der rCBF-Auswertung mittels Laser-Doppler-Messungen aufgrund der geringen Eindringtiefe des Lichtstrahls (Fukuda et al., 1995) nur bedingt für die Bewertung der Wirksamkeit der mikrobläschenverstärkten Sonothrombolyse.

Nach Einbringen des PRP-Thrombus kam es in allen Gruppen zu einem starken Abfall des rCBF ($\leq 35\%$ des Baseline-Wertes; Signifikanzlevel: $p < 0,05$). Um die bei Thrombembolienmodellen häufig vorkommenden Spontanrekanalisierungen ausschließen zu können, muss der rCBF unbedingt regelmäßig überprüft werden. In der vorliegenden Studie lieferten deshalb auch bereits die rCBF-Werte nach der 90-minütigen Ischämiezeit kurz vor Beginn der Therapie deutliche Hinweise, dass es bei keinem der Tiere zu einer Spontanrekanalisierung gekommen war (rCBF-Werte $\leq 30\%$ des Baseline-Wertes in allen Gruppen; Signifikanzlevel: $p < 0,05$). Ein weiteres Zeichen für die hohe Stabilität der PRP-Thromben.

In den beiden Behandlungsgruppen kam es nach der Therapie zu einem nicht signifikanten Anstieg des rCBF-Wertes um 35% (rt-PA) und 40% (BR38) im

Vergleich zum rCBF-Wert prä Therapie. In der Kontrollgruppe fällt der rCBF um weitere 6% im Vergleich zum Wert vor der Therapie nicht signifikant ab. Dies mag als Zeichen der fortschreitenden Ischämie und der Ausbreitung des Infarktkerns auf die umliegende Penumbra zu werten sein. Letztlich lässt sich aber auch aus diesen Befunden lediglich sagen, dass die oberflächlichen kortikalen Gefäße der Gehirne der beiden Behandlungsgruppen besser durchblutet waren als die der Kontrollgruppe.

1.2.3 Sicherheitsevaluation

Bei keinem der Studientiere ließen sich makroskopisch Hämorrhagien nachweisen, jedoch sollten die Gehirne dieser Studientiere ebenfalls histologisch auf Blutungen und eventuelle hämorrhagische Transformationen untersucht werden. Auch die immunhistochemische Untersuchung der Endothelbeschaffenheit ist bei den Gehirnen dieser Studientiere in Betracht zu ziehen.

Die SAB der zwei ausgeschlossenen SHR waren mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit durch den Katheter und nicht durch die Sonothrombolyse verursacht. Bei diesen Tieren kam bei der Laser-Doppler-Messung post Okklusion wie auch schon bei den SAB-Tieren aus Experiment I zu einem sehr starken Abfall des rCBF auf unter 10% des Baseline-Wertes. Eines der SAB-Tiere wurde schließlich in die Kontrollgruppe randomisiert, die keine Ultraschallbehandlung erhielt. Dennoch sollte das Gehirn des anderen Tieres, das eine Behandlung mit Ultraschall erfahren hatte, noch histologisch auf weitere Blutungen untersucht werden.

1.2.4 Resümee und Ausblick

Die Ergebnisse des Experimentes II deuten auf eine mögliche Wirksamkeit der mikrobläschenverstärkten Sonothrombolyse im makrovaskulären Modell hin. Auch die reine Lysetherapie mit rt-PA scheint entsprechend der Ergebnisse der Laser-Doppler-Untersuchungen zu einer gewissen Verbesserung der Durchblutung der oberflächlichen kortikalen Gefäße geführt zu haben. Mit endgültiger Sicherheit kann dies aber letztlich erst geklärt werden, wenn die Gehirne mit dem Mikro-CT gescannt und untersucht worden sind. Zudem ist die anschließende histologische und

eventuell auch immunhistologische Untersuchung auf Blutungen, Infarktgrößen und Endothelbeschaffenheit für die abschließende Sicherheitsevaluierung als unabdingbar anzusehen.

Für die weitere Forschung im makrovaskulären Modell sollten die hier vorgefundenen Ergebnisse auf jeden Fall berücksichtigt werden. Strebt man beispielsweise die komplette Rekanalisierung des makrovaskulären Verschlusses in den Behandlungsgruppen und vor allem in der Gruppe mit der mikrobläschenverstärkten Sonothrombolyse an, so müssen die Studienprotokolle entsprechend angepasst werden. Der PRP-Thrombus hat sich in diesem Experiment als zu stabil für die Lyse erwiesen. Stattdessen können zum Beispiel die weniger stabilen, fibrinreichen Thromben mit der Methode nach Busch und Mitarbeitern (1997) hergestellt und verwendet werden. Hier muss dann allerdings vermehrt das Augenmerk auf die rCBF-Werte der Laser-Doppler-Messungen kurz vor Therapiebeginn gelegt werden, um Tiere mit etwaigen Spontanrekanalisierungen aus der Studie ausschließen zu können. Eine weitere Möglichkeit wäre die weitere Nutzung der PRP-Thromben mit einer Anpassung des Therapieprotokolls auf längere Beschallungs- und Wirkstoffapplikationszeiten, veränderte Ultraschalleinstellungen oder eine Erhöhung der BR38-Dosis unter Berücksichtigung der entsprechenden Sicherheitsevaluation.

1.3 Einsatzmöglichkeiten in der Veterinärmedizin

Mikrobläschenhaltige Echokontrastverstärker werden seit einigen Jahren auch in der veterinärmedizinischen Ultraschalldiagnostik verwendet, ohne dass es Berichte von unerwünschten Wirkungen gegeben hat (Ohlerth und O'Brien, 2007). Tab. 5-1 gibt einen groben Überblick über die bei Hund und Katze eingesetzten Präparate und die geschallten Organsysteme.

Daher wäre auch in der Veterinärmedizin der therapeutische Einsatz der Mikrobläschenpräparate in Kombination mit Ultraschall und einem oder mehreren Fibrinolytika zur Therapie arterieller und venöser Thrombembolien bei Tieren denkbar.

Tierart	Echokontrastverstärker	Organsystem	Studie
Hund	SonoVue®	Milz	Ohlerth et al., 2007 und 2008 Rossi et al., 2008 Taeymans und Penninck, 2011
		Leber	O'Brien et al., 2004 Nyman et al., 2005
	Definity®	Leber	O'Brien et al., 2004 O'Brien, 2007
	Sonazoid®	Milz	Nakamura et al., 2009
		Leber	Kanemoto et al., 2009 Nakamura et al., 2010b
	Perfluorbutan	Milz	Nakamura et al., 2010a
	aufgeschüttelte Kochsalzlösung	Herz	Arndt und Oyama, 2008
	keine Angabe im Abstract	Pankreas, Duodenum	Johnson-Neitman et al., 2012
Katze	Levovist®	Pankreas	Rademacher et al., 2008
	Definity®	Milz	Leinonen et al., 2011a
		Niere	Leinonen et al., 2011b
	keine Angabe im Abstract	Niere, Leber, Pankreas, Dünndarm, mesenterische Lymphknoten	Leinonen et al., 2010

Tab. 5-1: Beispiele für die Verwendung von Echokontrastverstärkern in der veterinärmedizinischen Ultraschalldiagnostik

1.3.1 Schlaganfall beim Tier? – Schlaganfall beim Tier!

Berichte über Schlaganfälle beim Tier existieren nur vereinzelt (Garosi et al., 2005; Cherubini et al., 2007; Negrin et al., 2009; Gonçalves et al., 2011; Altay et al., 2011). Diese sind dann aber durch Sektionsbefunde oder seit neuestem auch durch die MRT- und CT-Diagnostik am noch lebenden Tier abgesichert, so dass prinzipiell davon ausgegangen werden kann, dass auch Tiere einen Schlaganfall erleiden können.

Gründe für die spärlichen Fallberichte gibt es viele. Einer der Hauptgründe wird sicher sein, dass ein Großteil der Schlaganfälle beim Tier aufgrund der fehlenden diagnostischen Möglichkeiten nicht dargestellt und sicher nachgewiesen werden

kann. Viele tierärztliche Praxen sind aufgrund der fehlenden technischen Ausstattung (MRT, CT) nicht in der Lage, zuverlässig Schlaganfälle zu diagnostizieren und die anschließende Intensivtherapie durchzuführen.

Zum anderen stellt sich natürlich die Frage, ob Schlaganfälle bei Tieren tatsächlich so häufig wie beim Menschen vorkommen. In der Anatomie der gehirnversorgenden Gefäße gibt es letztlich große tierartliche Unterschiede.

Vor allem bei Hunden ist ein gut ausgebildetes Netz intra- und extrakranieller Anastomosen vorhanden, welche das Gehirn vor den Auswirkungen eines zerebralen Gefäßverschlusses höchst effektiv schützen. Deshalb eignet sich diese Tierart für die Schlaganfallforschung auch nur unzulänglich (Casals et al., 2011; Garosi und McConnell, 2005). Selbst bei beidseits ligierten Aa. vertebrales und Aa. carotides internae sorgen die unzähligen Kollateralen beim Hund für eine ausreichende arterielle Blutversorgung des Gehirns (Gillilan, 1976).

Bei unseren Haustierarten wird insbesondere das Rete mirabile, lateinisch für „Wundernetz“, ein Plexus feiner anastomosierender Arterien dafür verantwortlich gemacht, dass ein Verschluss der A. cerebri media in der Regel zu keinem ischämischen Schlaganfall führt (Gillilan, 1974 und 1976; Howells et al., 2010).

Die proximalen Anteile der A. carotis interna sind beim Hund nur recht schwach, bei Katze, Schaf, Schwein und Rind überhaupt nicht ausgebildet. Diese Tierarten besitzen dafür eine extrakranielle Gefäßanastomose zwischen der A. maxillaris und/oder der A. carotis externa und dem gut ausgebildeten Rete mirabile, die intrakraniell in den distalen Anteil der A. carotis interna übergeht (Gillilan, 1974 und 1976). Bei Schafen, Schweinen und Rindern geben die kaudalen Anteile der A. carotis interna beidseits schließlich noch Äste zur A. basilaris ab (Gillilan, 1974). Katzen besitzen neben dem internen Rete mirabile auch ein großes externes „Wundernetz“, welches die A. maxillaris umgibt und von dort ebenfalls Gefäßäste in Richtung Zerebrum abgibt (Gillilan, 1976).

Auch die Blutversorgung des Gehirnstamms von Hund und Katze wird von unzähligen Ästen der Vertebralarterien sichergestellt. Beim Hund gibt es zusätzlich noch einen Ramus occipitalis, der ebenfalls das Rete mirabile versorgt (Gillilan, 1976). Beim Rind wird das Rete mirabile ebenfalls durch Äste von den Vertebral- und Okzipitalarterien versorgt (Gillilan, 1974).

Von unseren Haustierarten besitzt lediglich das Pferd kein Rete mirabile. Die A. carotis interna verläuft bei dieser Tierart extrakraniell langgestreckt und gewunden und die A. basilaris entsteht aus der Fusion zerebraler Äste der Okzipitalarterien (Gillilan, 1974).

Beim Mensch gibt es das Rete mirabile wie oben beschrieben nicht (de Gutiérrez-Mahoney und Schechter, 1972). Wenn es in der heutigen Zeit im humanmedizinischen Kontext auftaucht, so beschreibt es laut Pranghofer (2009) ein pathologisches Symptom und nicht mehr die schlichte anatomische Struktur.

Ob die Gründe für die wenigen Berichte über Schlaganfälle bei Tieren nun in der ausgeprägten Kollateralenversorgung der zerebralen Blutgefäße liegen und Schlaganfälle eben nur bei Tieren mit individuell anatomischen Besonderheiten auftreten oder ob Schlaganfälle bei Tieren doch häufiger auftreten, dann aber aufgrund der fehlenden diagnostischen Möglichkeiten nicht erkannt werden, verbleibt letztlich Spekulation.

Tiere mit gravierender neurologischer Symptomatik werden auch eher euthanasiert, als dass eine umfangreiche Diagnostik mit anschließender Intensivtherapie durchgeführt wird. Bei wie vielen Tieren mit milder neurologischer Symptomatik letztlich ein kleiner Schlaganfall vorliegt, kann nur erahnt werden. Auf jeden Fall sollte vor allem bei Tieren mit Anzeichen eines zentralen Vestibularsyndromes auch an einen Schlaganfall gedacht werden. Bereits 1988 wiesen Bagley und Mitarbeiter darauf hin, dass bei Hunden mit Symptomen eines zentralen Vestibularsyndromes und akuten Anzeichen einer zentralnervösen Störung an thrombosierte zerebrospinale Gefäße zu denken sei, nachdem sie bei einem Hund postmortal einen Kleinhirninfrakt diagnostiziert hatten. Gonçalves und Mitarbeiter (2011) konnten bei 16 Hunden mit Symptomen des zentralen Vestibularsyndromes mittels MRT Thalamusinfarkte nachweisen. Negrin und Mitarbeitern (2009) gelang es ebenfalls mittels MRT bei einem Hund als Ursache für die rezidivierenden zentralen neurologischen Symptome des Tieres eine infarzierte A. cerebelli caudalis mit korrespondierendem Kleinhirninfrakt nachzuweisen. Cherubini und Mitarbeiter (2007) konnten mittels MRT zeigen, dass das zentrale Vestibularsyndrom bei Katzen ursächlich ebenfalls auf Infarkte im Kleinhirn zurückgehen kann.

Selbstverständlich hat nicht jedes Tier, das in der tierärztlichen Praxis mit Symptomen eines zentralen Vestibularsyndromes vorgestellt wird, auch einen Schlaganfall. Als Differentialdiagnosen kommen bei Hund und Katze Entzündungen und Infektionen des zentralen Nervensystems, Primärtumoren oder Metastasen anderer Tumoren im Gehirn, Schädel-Hirn-Traumata und Anomalien sowie nur bei der Katze auch noch Thiaminmangel in Frage (Garosi, 2007). Aber gerade auch aufgrund der in Frage kommenden Differentialdiagnosen sollte bei der Vorstellung eines Patienten mit Symptomen eines zentralen Vestibularsyndromes die entsprechende Diagnostik (MRT, CT) eingeleitet werden oder der Patient an eine Spezialklinik überwiesen werden.

Schlussfolgernd lässt sich daher sagen, dass derzeit ein Einsatz der mikrobläschenverstärkten Sonothrombolyse in der Schlaganfalltherapie beim Tier außerhalb spezialisierter Kliniken als unwahrscheinlich anzusehen ist. Aufgrund der fehlenden Technik zur Diagnostik und intensivmedizinischen Überwachung sind viele tierärztliche Praxen nicht in der Lage, Schlaganfälle sicher zu diagnostizieren und für die Durchführung einer adäquaten und schnellen intensivmedizinischen Behandlung zu sorgen. Für Kliniken mit der entsprechenden technischen Ausstattung stellt die Diagnostik und Therapie tierischer Schlaganfallpatienten aber mit Sicherheit ein spannendes Betätigungsfeld dar.

1.3.2 Mikrobläschenverstärkte Sonothrombolyse bei Tieren mit akuten peripheren arteriellen und venösen Embolien und Thrombosen?

Denkbar wäre der Einsatz der mikrobläschenverstärkten Sonothrombolyse auch bei diversen anderen thrombembolischen Krankheitsbildern der Veterinärmedizin, für die es bislang nur unbefriedigende thrombolytische Therapieoptionen gibt.

Zu nennen wäre hier beispielsweise der aortale Thrombembolismus bei der hypertrophen Kardiomyopathie der Katze. Sowohl die intravasale thrombolytische Therapie mit Aspirin und Heparin (Schoeman, 1999) als auch die rheolytische Thrombektomie (Reimer et al., 2006) erzielen lediglich Überlebensraten von 39 (Thrombolyse) bis 50% (Thrombektomie). Bei den betroffenen Katzen könnte die Wirkung der eingesetzten Fibrinolytika zunächst lokal per Ultraschall verstärkt und

die Wirksamkeit dieser sonothrombolytischen Therapie zusätzlich noch mittels Einsatz eines Mikrobläschenpräparates weiter erhöht werden. Selbstverständlich muss die primäre Ursache des aortalen Thrombembolismus, die hypertrophe Kardiomyopathie ebenfalls therapiert werden.

Weitere vorstellbare Einsatzgebiete der mikrobläschenverstärkten Sonothrombolyse in der Veterinärmedizin sind die Rekanalisierung und Aufrechterhaltung der Perfusion und Verbesserung der Mikrozirkulation bei der disseminierten intravasalen Koagulopathie (Ralph und Brainard, 2012) (lokale Ultraschallbehandlung einiger der betroffenen Organe, wie beispielsweise Gliedmaßen, Nieren, Leber, Zentralnervensystem,...) sowie die lokale Anwendung bei katheterassozierten Thrombophlebitiden von Pferd (Geraghty et al., 2009) und Rind (Pusterla und Braun, 1996).

2. Der Einfluss der Bläschengröße auf zerebrale Luftmikroembolisationen

Die in der Humanmedizin zur Prävention zerebraler Gasmikroembolisationen (GME) üblichen, klassischen Filtersysteme bestehen meist aus Netzen mit unterschiedlichen Maschenweiten (Schönburg et al., 2001; Gerriets et al., 2010b). Durch diese Netze kommt es aber vermutlich nicht nur zu einem reinen Abfangen der Gasbläschen, sondern auch zu einem Zerstäuben größerer Bläschen in viele kleinere. Da dabei das Gesamtgasvolumen jedoch gleich bleibt, geht diese Verkleinerung der Größe mit einer starken Vergrößerung der potentiell schädlichen Oberfläche einher. Daher stellte sich die Frage nach dem Nutzen derartiger Netzfilter im präventiven Einsatz gegen das Auftreten gasförmiger Emboli.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Schädlichkeit unterschiedlich großer Luftbläschen bei gleichbleibendem Gasvolumen auf die zerebrale Zirkulation untersucht.

2.1 Verlässlichkeit des gewählten Modells und weitere Einsatzmöglichkeiten

Jahrzehntelang verhinderten technische Probleme die zuverlässige und vor allem standardisierte experimentelle Forschung zu GME. Die Schwierigkeiten lagen in der gezielten arteriellen Injektion, der Unterbrechung des physiologischen Blutflusses, zu großen injizierten Luftvolumina und stark schwankenden Bläschengrößen (Furlow, 1982). Der größte Teil dieser Probleme konnte mittlerweile gelöst werden, jedoch gibt es derzeit immer noch kaum tierexperimentelle Studien zu GME, bei denen eine gezielte Anzahl an Gasbläschen einer bestimmten Größe in die Zirkulation eingebracht werden (Weenink et al., 2012). Das in der Arbeitsgruppe entwickelte Gasbläschenmodell (Gerriets et al., 2010c) ermöglicht aber genau dies.

Wie der Vergleich zwischen der für das Experiment III angestrebten und tatsächlich vorkommender Anzahl und Größe der Bläschen zeigt, lagen die Abweichungen mit 0,05 bis 1,8% in den einzelnen Parametern im vernachlässigbaren Bereich.

Alle Tiere erhielten dabei dieselbe Menge an Spüllösung ($0,65 \text{ ml} \pm 0,1 \text{ ml}$) injiziert. Wie sich bei den Sham-operierten Tieren zeigte, hatte dieses Volumen keine negativen Auswirkungen auf die zerebrale Zirkulation, wenn es mit einer Flussgeschwindigkeit von 20 ml/h eingeleitet wurde. Die Tiere der Sham-Gruppe zeigten weder klinisch-neurologische Symptome, noch ließen sich in den Untersuchungen mit dem MRT ischämische Areale oder Ödeme im Gehirn nachweisen.

Das für das Experiment verwendete Gasbläschenmodell eignet sich also hervorragend dazu, gezielt Fragestellungen zu Auswirkungen der Bläschengröße und des applizierten Gesamtgasvolumens zu untersuchen und ermöglicht es sogar, die Effekte unterschiedlicher Gase zu evaluieren. Letzteres könnte für zukünftige Studien interessant werden. In der Humanmedizin wird beispielsweise bei Eingriffen am Thorax und am offenen Herzen das Operationsfeld mit Kohlendioxid geflutet, da es im Vergleich zu Luft zum einen aufgrund seiner 1,5-fach größeren Dichte diese verdrängt und es zum anderen eine bessere Löslichkeit in Flüssigkeiten aufweist (Ng und Rosen, 1968). Die Flutung des Operationsgebietes mit Kohlendioxid scheint mit einer Reihe an positiven Effekten verbunden zu sein, wie mehrere Studien anhand der Reduktion der postoperativen Mortalität und der intrakardial nachweisbaren Bläschen nachweisen konnten (Kalpokas et al., 2003; Svenarud et al., 2004; Skidmore et al., 2006). Jedoch gibt es bis dato keine klaren Hinweise auf eine geringere Zahl an zerebrovaskulären und neurokognitiven Komplikationen bei den so operierten Patienten (Giordano und Biancari, 2009; Chaudhuri und Marasco, 2011), so dass weitere – auch präklinische – Studien in diesem Forschungsfeld nötig sind, um eine genaue Schaden-Nutzen-Abwägung durchführen zu können.

2.2 Kommt es tatsächlich auf die Größe an?

Um die Zerstäubung größerer Gasbläschen in viele kleinere zu simulieren, wurden in Experiment III die Gasbläschendurchmesser $45 \mu\text{m}$ (kleine Bläschen, Studiengruppe B) und $160 \mu\text{m}$ (große Bläschen, Studiengruppe C) gewählt. Bei dem eingeleiteten Gesamtvolumen von $85,8 \text{ nl}$ entspricht das 40 großen und 1800 kleinen Bläschen.

Eines der großen Luftbläschen hat dabei ein fast 45-mal so großes Volumen wie eines der kleinen Bläschen und die Oberfläche des großen Bläschens ist knapp 13-mal so groß wie das des kleinen Bläschens. Betrachtet man jedoch die Oberfläche aller Bläschen zusammen, so kehrt sich dieses Verhältnis um. Die Gesamtoberfläche der großen Bläschen beträgt jetzt nur noch das 0,28-fache der kleinen Luftbläschen oder anders ausgedrückt: nun haben die kleineren Bläschen eine 3,56-mal größere Oberfläche als die großen Bläschen (Tab. 5-2). Dies führt auch zu einer entsprechenden Erhöhung der potentiellen Gefahr, die durch den Kontakt zwischen Oberfläche und Endothel der zerebralen Blutgefäße entsteht (Barak und Katz, 2005).

Gruppe		B		C		Faktor
		Kleine Bläschen		Große Bläschen		
Anzahl	Größe	1800	45 µm	40	160 µm	
Volumen einzelnes Bläschen (a)		47712 µm ³		2144660,6 µm ³		$V_C / V_B = 44,95$
Gesamtvolumen (b)		85881600 µm ³ = 85,8 nl		85786423,4 µm ³ = 85,8 nl		$V_C / V_B = 1$
Oberfläche einzelnes Bläschen (c)		6361,7 µm ²		80424,8 µm ²		$A_C / A_B = 12,64$
Gesamtoberfläche (d)		11451060 µm ² = 11,45 mm ²		3216992 µm ² = 3,22 mm ²		$A_C / A_B = 0,28$ $A_B / A_C = 3,56$

Tab. 5-2: Volumina und Oberflächengrößen der Bläschen (Formeln zur Bestimmung (a) des Kugelvolumens: $V = 1/6 * \pi * d^3$, (b) des Gesamtvolumens = Anzahl der Bläschen * V ; (c) der Kugeloberfläche: $A = \pi * d^2$, (d) der Gesamtoberfläche = Anzahl der Bläschen * A)

Weder die in den beiden Bläschengruppen gefundenen klinisch-neurologischen Befunde noch die Veränderungen im MRT oder die Anzahl der Infarkttiere in beiden Gruppen deuten auf einen klinisch relevanten Einfluss der unterschiedlichen Bläschengrößen hin. Es lässt sich lediglich eine Tendenz zu größeren Infarkten in der Gruppe mit den kleinen Luftbläschen erkennen. Das Signifikanzlevel liegt jedoch bei $p=0,93$ mit dem Mann-Whitney-U-Test und weist damit auf keine statistische Signifikanz hin.

Aufgrund der 3,56-fachen Vergrößerung der zur Verfügung stehenden schädlichen Oberfläche wurde erwartet, dass die Tiere aus der Studiengruppe mit den kleinen Gasbläschen auch in diesem Verhältnis entsprechend größere Infarkte als die Tiere mit den großen Gasbläschen zeigen würden. Entsprechend dieser erwarteten großen Differenz wurden die Studiengruppengrößen berechnet.

Retrospektiv lässt sich jedoch erkennen, dass pro Gruppe mehr Tiere benötigt worden wären, um eine entsprechend sichere statistische Aussage treffen zu können. Auch zeigte sich, dass die Ergebnisse viel stärker gestreut haben, als aus den Vorstudien zu erwarten gewesen war (Gerriets et al., 2010c; unveröffentlichte Ergebnisse). Dennoch lässt sich aus den Ergebnissen die Aussage treffen, dass sich Gasbläschen spätestens im Gefäß völlig unvorhersehbar verhalten, wie auch schon andere Studien gezeigt haben. Gasbläschen einer Größe über 10 μm bleiben früher oder später in einem Gefäß des entsprechenden Kalibers stecken und verlegen dort für unterschiedlich lange Zeit den Blutfluss (Mitchell und Gorman, 2002; Kau et al., 2008). Größere Gasbläschen können sich in viele kleinere aufspalten, viele kleine können sich jedoch auch zu einem größeren zusammenlagern (Weenink et al., 2012; Barak und Katz, 2005). Selbst kleinste Mikrobläschen sind noch in der Lage, über ihren Kontakt zum Endothel größeren Schaden anzurichten (Feinstein et al., 1984; Helps et al., 1990; Hills und James, 1991; Johansson, 1980).

Je kleiner ein Gasbläschen jedoch ist, desto schneller löst es sich in Flüssigkeit auf. Gemäß der Gleichung von Epstein und Plesset (1950) löst sich laut Barak und Katz (2005) ein Luftbläschen mit einem Radius von 1 μm in Wasser innerhalb einer Sekunde auf. Bei 10 μm Radius benötigt das Luftbläschen bereits eine bis sechs Sekunden bis zur Auflösung. Beträgt sein Radius 100 μm , so erhöht sich die Zeit auf 100 bis 600 Sekunden. Ein Luftbläschen mit einem Radius von 1 mm löst sich erst nach elf bis siebenzig Tagen auf.

Letztlich lässt sich aus den gewonnenen Ergebnissen die Aussage treffen, dass es scheinbar nicht auf die Größe der in das Gefäßsystem eingedrungen Bläschen ankommt, sondern nur auf das Gesamtvolumen des Gases. Dass mit steigenden Gasvolumen auch die Infarkte größer werden, konnten bereits frühere Studien der Arbeitsgruppe zeigen (Gerriets et al., 2010c).

Dennoch sind auch hier weitere Studien nötig, um eine abschließende Aussage treffen zu können. Spannend wäre es sicher auch noch, die Gehirne auf (immun)histologischer Ebene auf Schäden an den Gefäßwänden zu untersuchen und eventuell entstandene Thromben nachzuweisen. Auch die Untersuchung nach Inflammationsmarkern und freien Sauerstoffradikalen könnte sich lohnen.

Besonderes Augenmerk sollte dabei vielleicht auch auf die beiden Tiere mit klinisch-neurologischen Auffälligkeiten gelegt werden, bei denen sich in den Untersuchungen mit dem MRT keine Ödembildung oder ischämische Infarzierung des Gehirns zeigten. Möglicherweise lässt sich aus dem hier genutzten Gasbläschenmodell ein Tiermodell entwickeln, das ein Korrelat zu den neuropsychologischen und neurokognitiven Störungen von Patienten nach Operationen mit der Herz-Lungen-Maschine darstellt. Selbstverständlich müssten dazu auch die entsprechenden neuropsychologischen und neurokognitiven Testungen am Tier/an der Ratte etabliert werden.

2.3 Neuevaluierung der bestehenden Präventionsmaßnahmen

In der Humanmedizin kommen bei Operationen mit der Herz-Lungen-Maschine unterschiedlichste Filtersysteme zur Reduktion der GME zum Einsatz. So gibt es zum Abfangen von Gas- und partikulärer Emboli klassische Netzfilter mit unterschiedlichen Maschenweiten (Pugsley et al., 1994; Schönburg et al., 2001), es kommen heparinisierte Polyesternetze mit einer Maschenweite von 120 µm (Embol-X-Filter) (Gerriets et al., 2010b) und Filter wie die „dynamic bubble trap“ (DBT) zum Einsatz (Gerriets et al., 2010b; Schönburg et al., 2001, 2003 und 2006; Perthel et al., 2005). Weiterhin gibt es Filter, die schon im Oxygenator integriert sind und dort die Gasmikroemboli reduzieren (Qiu et al., 2010). Alle haben das Ziel, Gasemboli (und bei den Netzfiltern auch korpuskuläre Emboli) aus dem zirkulierenden Blut heraus zu fangen und damit das Gesamtgasvolumen zu vermindern.

Die Netzfilter (darunter zählt in diesem Sinne auch der Embol-X-Filter) scheinen dieser Aufgabe jedoch nur bedingt gewachsen. Zwar fangen sie höchst effektiv Festkörper-Emboli wie Zelltrümmer und Fibrin ab, verstopfen aber aufgrund ihres „Fanges“ und erhöhen damit den Widerstand bis hin zu einer kompletten Flussblockade. Weiterhin gibt es auch Hinweise darauf, dass diese Filter die

Gerinnungskaskade und das Komplementsystem aktivieren und damit auch zur Inflammation führen (Barak und Katz, 2005). Größere gasförmige Emboli zerstäuben durch sie vermutlich eher in viele kleinere, was jedoch nicht das Gesamtgasvolumen reduziert. Wie jedoch das vorliegende Experiment andeutet, kommt es nicht auf die Größe der Gasbläschen, sondern auf die im Körper zirkulierende Gesamtgasmenge an, weshalb der Nutzen der Netzfilter zur Verhinderung von GME in Frage gestellt werden muss.

Der DBT-Filter hingegen führt über das Herausfangen von Gasemboli zu einer tatsächlichen Reduktion der Gesamtgasmenge und bewirkt vermutlich deshalb die signifikante Verbesserung der Neurokognition der damit operierten Patienten (Gerriets et al., 2010b).

Weiterhin gibt es noch die Möglichkeit, GME mittels Ultraschall zu verhindern/reduzieren.

Der EmBlocker™ verhindert mit ablenkenden Ultraschallwellen im 2,2 MHz-Bereich, dass Festkörper- und Gasemboli überhaupt in die gehirnzuführenden Gefäße eindringen können und führt nachweislich zu einer Reduktion der nachweisbaren zerebralen Mikroemboli. Dabei scheint die Wirkung auf die gasförmigen Emboli größer zu sein als auf die Festkörperemboli (Sauren et al., 2007 und 2009). Die Ablenkung der Emboli bedeutet allerdings auch, dass sie weiter im Körperkreislauf zirkulieren können. Es stellt sich also die Frage, ob die so abgelenkten „Fremdkörper“ nicht irgendwo anders im Körper Schaden anrichten werden.

Der „Bubble Buster“, der in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelt wurde, arbeitet dagegen mit niederfrequentem 60 kHz-Ultraschall und eliminierte in eigenen *in vitro*-Versuchen im arteriellen Schenkel der extrakorporalen Zirkulation bis zu 87,1% der Luftemboli und reduzierte die Größe bei 99% der verbleibenden Gasbläschen auf unter 15 µm (Nedelmann, *Schleicher* et al., Publikation eingereicht und akzeptiert).

Damit erfüllt er die Vorgaben für die erfolgreiche Reduktion von GME und ihrer Konsequenzen: einerseits reduziert er das zirkulierende Gesamtgasvolumen, andererseits entstehen durch ihn Gasbläschen von so geringer Größe, dass sie sich laut der Gleichung von Epstein und Plesset (1950) und der Rechnung von Barak und Katz (2005) innerhalb weniger Sekunden sowieso von selbst auflösen.

3. Schaden und Nutzen von Gasbläschen in der zerebralen Zirkulation

Wovon hängt es nun also ab, ob Gasbläschen im Gehirn Schaden verursachen?

Im Vergleich zu den reinen, unbehüllten Luftbläschen aus Experiment III sind die Mikrobläschen der beiden Echokontrastverstärker BR1 und BR38 mit einer Phospholipidhülle ummantelt und bestehen aus perfluorhaltigen Gasen. Durch die Hülle wird ihr Verhalten im Blutgefäßsystem viel vorhersagbarer als das der unbehüllten Luftbläschen. Die ummantelten Mikrobläschen zerteilen sich nicht in viele kleinere und lagern sich auch nicht zu einem größeren zusammen. Ohne den zusätzlichen Einfluss von Ultraschall werden die Bläschen mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung abgebaut. Die Elimination erfolgt über Lunge (gasförmige Anteile), Nieren (filtern die Anteile der Hülle) und Leber (Elimination der Anteile der Hülle) (Ohlerth und O'Brien, 2007).

Weiterhin dürfte es aufgrund der geringen Größe der in den Präparaten enthaltenen Mikrobläschen (mittlerer Durchmesser BR1: 2,5 µm; BR38: 1,4 µm) auch zu keinen Okklusionen der Gefäße kommen (abgeleitet aus den Erkenntnissen von Lindner et al. (2002) bei seinen Versuchen mit Definity), wie es bei den Luftbläschen von 45 und 160 µm eben durchaus der Fall sein kann.

Es kann also gesagt werden, dass vor allem die Zusammensetzung und Umhüllung, die Größe und auch die Gesamtanzahl der Gasbläschen darüber entscheidet, ob sie in der zerebralen Zirkulation Schaden verursachen.

Die Nützlichkeit der perfluorhaltigen Mikrobläschen in der sonothrombolytischen Therapie entsteht letztlich auch erst im Zusammenspiel mit dem Ultraschall.

VI Zusammenfassung

Gasbläschen, die in die zerebrale Zirkulation gelangen, ziehen ein mannigfaltiges Spektrum unterschiedlichster Symptome und Auswirkungen nach sich. Je nach ihrer Größe und Zusammensetzung können sie den zerebralen Blutfluss stören, zu inhomogenen Blutumverteilungen und Störungen der Blut-Hirn-Schranke führen und die Inflammation, die Thromben- und Ödembildung im Gehirn fördern. Die Konsequenzen dieser pathophysiologischen Vorgänge reichen von subtilen neuropsychologischen und neurokognitiven Störungen über ischämische Gehirnfarkte bis hin zum Tod des betroffenen Lebewesens. Andererseits können Mikrobläschen einer bestimmten Größe und Zusammensetzung aber auch nutzbringend in der Ultraschalldiagnostik als Echokontrastverstärker eingesetzt werden. Derartige Mikrobläschenpräparate werden mittlerweile bei Schlaganfallpatienten auch gezielt in die zerebrale Zirkulation gebracht, um dort die Wirkung der sonothrombolytischen Therapie zu verstärken und die thrombotisch/embolisch blockierten Gefäße schneller zu rekanalisieren.

Das Ziel der ersten Studie der vorliegenden Arbeit war die Evaluation der sonothrombolytischen Wirksamkeit und Sicherheit des neuen Mikrobläschenpräparates BR38 und des bereits bekannten Präparates SonoVue® im Tiermodell zum „No Reflow“-Phänomen (mikrovaskuläres Ischämie-Reperusionsmodell). Beide Präparate erzielten in Kombination mit 3 MHz-Ultraschall gute bis sehr gute Rekanalisierungsraten. Vorsicht ist bei Dosisreduktionen von BR38 geboten, da die Studiengruppe mit der reduzierten Dosis im Vergleich zu den anderen Ultraschallgruppen tendenziell eine geringere Rekanalisierungsrate aufwies. Das Fibrinolytikum rt-PA scheint in der Monotherapie keine Wirksamkeit auf das „No Reflow“-Phänomen zu besitzen. Die Sicherheitsevaluation ergab makroskopisch bei keinem der Tiere Hinweise auf Hämorrhagien.

Mit der zweiten Studie der Arbeit wurde die Wirksamkeit von BR38 in Kombination mit 3MHz Ultraschall im Vergleich zu der von rt-PA ohne Ultraschall und einer Kontroll-Gruppe auf das makrovaskuläre Thrombemboliemodell untersucht. Eine komplette Auflösung des Gerinnsels konnte in keiner der Studiengruppen beobachtet werden. Bei der makroskopischen Betrachtung der Gehirne der

mikrobläschenverstärkten Sonothrombolysegruppe gibt es Anzeichen auf eine mögliche Wirkung auf die Gerinnsel aus thrombozytenreichem Plasma. Es bleibt zu untersuchen, ob die Auflösung dieser stabilen Thromben mit einer Anpassung des Studienprotokolls möglich ist (beispielsweise verlängerte Behandlungszeiten, andere Ultraschalleinstellungen, Erhöhung der BR38-Dosis). Die makroskopische Sicherheitsevaluation ergab keine Blutungen.

In der Veterinärmedizin ist der Einsatz der Mikrobläschenpräparate neben der Anwendung in der Therapie von Schlaganfallpatienten – ein Krankheitsbild, über das es bei Tieren kaum Berichte gibt – eventuell auch bei der Therapie anderer thrombembolischer Krankheitsbilder (wie dem feline aortalen Thrombembolismus, der disseminierten intravasalen Koagulopathie und Thrombophlebitiden) möglich.

Die dritte Studie sollte klären, welchen Einfluss die Größe von im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe entstehender Luftbläschen auf die zerebrale Zirkulation hat und welche Konsequenzen daraus für bestehende Präventionsverfahren gegen zerebrale Luftmikroembolisationen entstehen. Das verwendete Modell erwies sich dabei als höchst verlässlich in der Produktion von Gasbläschen definierter Größe und Anzahl. Die Tiere wurden in zwei Gruppen mit unterschiedlichen Bläschengrößen (45 vs. 160 μm) aber insgesamt gleichem Luftvolumen (85,8 nl) randomisiert. Zwischen den Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede in der klinisch-neurologischen Symptomatik, den Infarktgrößen oder den Ödemparametern festgestellt werden. Die Gruppengrößen haben sich jedoch als zu klein erwiesen um abschließend sagen zu können, ob der Schweregrad zerebraler Luftmikroembolisationen und der daraus folgenden Konsequenzen von der Größe der Gasbläschen abhängt oder lediglich vom insgesamt in die Zirkulation eingedrungenen Gasvolumen. Dennoch sollte bei der Prävention zerebraler Gasmikroembolisationen Wert darauf gelegt werden, dass Systeme zur Anwendung kommen, die vor allem das Gesamtgasvolumen reduzieren.

VII Summary

Gaseous bubbles that end up in the cerebral circulation cause a rich diversity of varying symptoms and consequences. According to their size and composition they may disturb the cerebral blood flow, cause heterogeneous redistributions of blood and disruptions of the blood brain barrier, and promote inflammation, clot and edema formation in the brain. The consequences of these pathophysiologic processes range from subtle neuropsychological and neurocognitive disorders to ischemic brain infarctions and to the death of the affected creature. Then again, microbubbles of a certain composition can be used most beneficial in diagnostic investigations by means of ultrasound contrast enhancing. By now such microbubble compounds are also purposefully administered to the cerebral circulation of human stroke patients to potentiate sonothrombolytic therapy and to accelerate the recanalization of thrombotic/embolic occluded vessels.

The aim of the first study of the present thesis was the sonothrombolytic efficacy and safety evaluation of the new microbubble compound BR38 and of the already known compound SonoVue® in an animal model that displayed the “no reflow” phenomenon (microvascular ischemia-reperfusion model). Both compounds showed in combination with 3 MHz ultrasound good to excellent recanalization rates. Caution is needed regarding dosage reduction of BR38: the study group with the reduced dosage displayed a tendency to lower recanalization rates compared to the other ultrasound treatment groups. The fibrinolytic drug rt-PA alone appears not to have any therapeutic use on the “no reflow” phenomenon. The safety evaluation displayed no macroscopic hemorrhages in any of the animals.

The second study of the thesis examined the efficacy of BR38 in combination with 3 MHz ultrasound in comparison to rt-PA without ultrasound and a control group in the macrovascular thromboembolic occlusion model. Complete lysis of the clot could not be seen in any of the three study groups. Macroscopic examination showed signs of a possible thrombolytic effect on the platelet-rich plasma clots in the brains of the microbubble enhanced sonothrombolysis group. It remains to be studied whether a complete lysis of the clots might be possible by adapting the study protocol (e.g.

longer treatment periods, different ultrasound settings, increasing the dosage of BR38). The macroscopic safety evaluation showed no hemorrhages.

Beside the usage of microbubble compounds in veterinary stroke therapy – a pathology of which only a few reports in animals exist – there might be a potential use in the therapy of other thromboembolic diseases of animals (e.g. feline distal aortal thromboembolism, DIC, thrombophlebitis).

The third study was conducted to examine the impact of the size of air bubbles evolving during cardiac surgery on the cerebral circulation and hence derive the consequences for existing methods of prevention of cerebral air microembolization. The used model showed high reliability in producing air bubbles of defined diameters and numbers. Animals were randomized into two groups with different bubble sizes (45 vs. 160 μm) but identical total air volumes (85.8 nl). No significant differences in neurological outcome, infarct size and edema formation could be seen between the two groups. However, the group sizes have been too small as to conclude if the severity of cerebral air microembolization and the subsequent arising consequences were dependent on bubble size or on the total volume of air in the circulation. Notwithstanding, the systems used in the prevention of cerebral air microembolization should particularly reduce the total amount of gas in the circulation.

VIII Literaturverzeichnis

1. Ahrar K, Stafford RJ, Tinkey PT, Borne AT, Stephens LC, Wallace MJ, Wright KC. Evaluation of cerebral microemboli during radiofrequency ablation of lung tumors in a canine model with use of impedance-controlled devices. *J Vasc Interv Radiol*. 2007;18(7):929-935
2. Akiyama M, Ishibashi T, Yamada T, Furuhashi H. Low-frequency ultrasound penetrates the cranium and enhances thrombolysis in vitro. *Neurosurgery*. 1998; 43(4):828-832; Diskussion: 832-833
3. Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA, Christou I, Barber PA, Burgin WS, Malkoff M, Wojner AW, Grotta JC. High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tPA infusion when continuously monitored with 2-MHz transcranial doppler monitoring. *Stroke*. 2000;31(3):610-614
4. Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Saggur M, Demchuk AM, Moyé LA, Hill MD, Wojner AW, CLOTBUST Investigators. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2004;351(21):2170-2178
5. Allegrini PR & Sauer D. Application of magnetic resonance imaging to the measurement of neurodegeneration in rat brain: MRI data correlate strongly with histology and enzymatic analysis. *Magn Reson Imaging*. 1992;10(5):773-778
6. Altay UM, Skerritt GC, Hilbe M, Ehrensperger F, Steffen F. Feline cerebrovascular disease: clinical and histopathologic findings in 16 cats. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2011;47(2):89-97
7. Ames A 3rd, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol*. 1968;52(2):437-453
8. Anwar M, Buchweitz-Milton E, Weiss HR. Effect of prazosin on microvascular perfusion during middle cerebral artery ligation in the rat. *Circ Res*. 1988;63(1): 27-34
9. Armon C, Deschamps C, Adkinson C, Fealey RD, Orszulak TA. Hyperbaric treatment of cerebral air embolism sustained during an open-heart surgical procedure. *Mayo Clin Proc*. 1991;66:565-571
10. Arndt JW, Oyama MA. Agitated saline contrast echocardiography to diagnose a congenital heart defect in a dog. *J Vet Cardiol*. 2008;10(2):129-132
11. Bagley RS, Anderson WI, de Lahunta A, Kallfelz FA, Bowersox TS. Cerebellar infarction caused by arterial thrombosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. 1988;192(6):785-787
12. Barak M, Katz Y. Microbubbles: pathophysiology and clinical implications. *Chest*. 2005;128(4):2918-2932

13. Beauchamp NJ Jr, Barker PB, Wang PY, vanZijl PC. Imaging of acute cerebral ischemia. *Radiology*. 1999;212(2):307-324
14. Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke*. 1995;26(6):1086-1091
15. Behrens S, Daffertshofer M, Spiegel D, Hennerici M. Low-frequency, low-intensity ultrasound accelerates thrombolysis through the skull. *Ultrasound Med Biol*. 1999;25(2):269-273
16. Behrens S, Spengos K, Daffertshofer M, Schroeck H, Dempfle CE, Hennerici M. Transcranial ultrasound-improved thrombolysis: diagnostic vs. therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol*. 2001;27(12):1683-1689
17. Belayev L, Pinard E, Nallet H, Seylaz J, Liu Y, Riyamongkol P, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD. Albumin therapy of transient focal cerebral ischemia: in vivo analysis of dynamic microvascular responses. *Stroke*. 2002;33:1077-1084
18. Benson J, Adkinson C, Collier R. Hyperbaric oxygen therapy of iatrogenic cerebral arterial gas embolism. *Undersea Hyperb Med*. 2003;30(2):117-126
19. Benveniste H, Hedlung LW, Johnson GA. Mechanisms of detection of acute cerebral ischemia in rats by diffusion weighted magnetic resonance microscopy. *Stroke*. 1992;23(5):746-754
20. Blanc P, Boussuges A, Henriette K, Sainty JM, Deleflie M. Iatrogenic cerebral air embolism: importance of an early hyperbaric oxygenation. *Intensive Care Med*. 2002;28(5):559-563
21. Bleeker H, Shung K, Barnhart J. On the application of ultrasonic contrast agents for blood flowmetry and assessment of cardiac perfusion. *J Ultrasound Med*. 1990;9(8): 461-471
22. Blomley MJ, Cooke JC, Unger EC, Monaghan MJ, Cosgrove DO. Microbubble contrast agents; a new era in ultrasound. *BMJ*. 2001;322(7296):1222-1225
23. Borger MA, Peniston CM, Weisel RD, Vasiliou M, Green RE, Feindel CM. Neuropsychologic impairment after coronary bypass surgery: effect of gaseous microemboli during perfusionist interventions. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;121(4):743-749
24. Bove AA. The basis for drug therapy in decompression sickness. *Undersea Biomed Res*. 1982;9(2):91-111
25. Bove AA, Hallenbeck JM, Elliott DH. Circulatory responses to venous air embolism and decompression sickness in dogs. *Undersea Biomed Res*. 1974;1(3):207-220

26. Bradbury LA, Archer DC, Dugdale AH, Senior JM, Edwards GB. Suspected venous air embolism in a horse. *Vet Rec.* 2005;156(4):109-111
27. Branger AB, Eckmann DM. Theoretical and experimental intravascular gas embolism absorption dynamics. *J Appl Physiol.* 1999;87(4):1287-1295
28. Busch R, Krüger K, Hossmann KA. Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res.* 1997;778(1):16-24
29. Busza AL, Allen KL, King MD, van Bruggen N, Williams SR, Gardian DG. Diffusion-weighted imaging studies of cerebral-ischemia in gerbils. Potential relevance to energy failure. *Stroke.* 1992;23(11):1602-1612
30. Butler BD, Hills BA. Transpulmonary passage of venous air emboli. *J Appl Physiol.* 1985;59(2):543-547
31. Cachin M, Vandeveld M. Cerebral infarction associated with septic thrombemboli in the dog. *Proceedings of the 8th Annual Meeting of the Veterinary Internal Medicine Forum, ACVIM 1990*; Seite: 1136
32. Casals JB, Pieri NC, Feitosa ML, Ercolin AC, Roballo KC, Barreto RS, Bressan FF, Martins DS, Miglino MA, Ambrósio CE. The use of animal models for stroke research: a review. *Comp Med.* 2011;61(4):305-313
33. Chaudhuri K, Marasco SF. The effect of carbon dioxide insufflation on cognitive function during cardiac surgery. *J Card Surg.* 2011;26(2):189-196
34. Cherubini GB, Rusbridge C, Singh BP, Schoeninger S, Mahoney P. Rostral cerebellar arterial infarct in two cats. *J Feline Med Surg.* 2007;9(3):246-53
35. Choudhri TF, Hoh BL, Zerwes HG, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES Jr, Kottirsch G, Pinsky DJ. Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1301-1310
36. Christiansen C, Kryvi H, Sontum PC, Skotland T. Physical and biochemical characterization of Albunex, a new ultrasound contrast agent consisting of air-filled albumin microspheres suspended in a solution of human albumin. *Biotechnol Appl Biochem.* 1994;19(Pt 3):307-320
37. Cintas P, Nguyen F, Boneu B, Larrue V. Enhancement of enzymatic fibrinolysis with 2-MHz ultrasound and microbubbles. *J Thromb Haemost.* 2004;2(7):1163-1166
38. Clark RE, Brillman J, Davis DA, Lovell MR, Price TR, Magovern GJ. Microemboli during coronary artery bypass grafting. Genesis and effect on outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;109(2):249-257; Diskussion: 257-258

39. Clark WM, Wissman S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S. Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA*. 1999;282(21):2019-2026
40. Clarke PR, Hill CR. Physical and chemical aspects of ultrasonic disruption of cells. *J Acoust Soc Am*. 1970;47(2):649-653
41. Cochran RP, Kunzelman KS, Vocelka CR, Akimoto H, Thomas R, Soltow LO, Spiess BD. Perfluorocarbon emulsion in the cardiopulmonary bypass prime reduces neurological injury. *Ann Thorac Surg*. 1997;63(5):1326-1332
42. Correias JM, Bridal L, Lesavre A, Mejean A, Claudon M, H el enon O. Ultrasound contrast agents: properties, principles of action, tolerance, and artifacts. *Eur Radiol*. 2001;11(8):1316-1328
43. Coyle P. Different susceptibilities to cerebral infarction in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive Sprague-Dawley rats. *Stroke*. 1986;17(3):520-525
44. Coyle P, Panzenbeck MJ. Collateral development after carotid artery occlusion in Fischer 344 rats. *Stroke*. 1990;21(2):316-321
45. Crowell RM, Olsson Y. Impaired microvascular filling after focal cerebral ischemia in the monkey. Modification by treatment. *Neurology*. 1972;22(5):500-504
46. Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P, Sitzler M, Sliwka U, Els T, Sedlaczek O, Koroshetz WJ, Hennerici MG. Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia: increased risk of hemorrhage with combined ultrasound and tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2005;36(7):1441-1446
47. Daffertshofer M, Hennerici M. Ultrasound in the treatment of ischaemic stroke. *Lancet Neurol*. 2003;2(5):283-290
48. Datasheet „Spontaneous Hypertensive Rat“ der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland; Stand: 13.09.2012
49. Datasheet „Wistar Unilever“ der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland; Stand: 13.09.2012
50. Datta S, Coussios CC, McAdory LE, Tan J, Porter T, De Courten-Myers G, Holland CK. Correlation of cavitation with ultrasound enhancement of thrombolysis. *Ultrasound Med Biol*. 2006;32(8):1257-1267
51. Dawson DA, Ruetzler CA, Hallenbeck JM. Temporal impairment of microcirculatory perfusion following focal cerebral ischemia in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res*. 1997;749(2):200-208

52. de Gutiérrez-Mahoney CG, Schechter MM. The myth of the rete mirabile in man. *Neuroradiology*. 1972;4(3):141-158
53. de la Torre E, Meredith J, Netsky MG. Cerebral air embolism in the dog. *Arch Neurol*. 1962;6(4):307-316
54. De Ley G, Nshimyumuremyi JB, Leusen I. Hemispheric blood flow in the rat after unilateral common carotid occlusion: evolution with time. *Stroke*. 1985;16(1):69-73
55. del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke*. 1991;22(10):1276-1283
56. Della Martina A, Meyer-Wiethe K, Allémann E, Seidel G. Ultrasound contrast agents for brain perfusion imaging and ischemic stroke therapy. *J Neuroimaging*. 2005;15(3):217-232
57. Dexter F, Hindman BJ. Recommendations for hyperbaric oxygen therapy of cerebral air embolism based on a mathematical model of bubble absorption. *Anesth Analg*. 1997;84(6):1203-1207
58. DiNapoli VA, Rosen CL, Nagamine T, Crocco T. Selective MCA occlusion: a precise embolic stroke model. *J Neurosci Methods*. 2006;154(1-2):233-238
59. Dinia L, Rubiera M, Ribo M, Maisterra O, Ortega G, del Sette M, Alvarez-Sabin J, Molina CA. Reperfusion after stroke sonothrombolysis with microbubbles may predict intracranial bleeding. *Neurology*. 2009;73(10):775-780
60. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999;22(9):391-397
61. Donnan GA, Baron JC, Ma H, Davis SM. Penumbra selection of patients for trials of acute stroke therapy. *Lancet Neurol*. 2009;8(3):261-269
62. Donnan GA, Davis SM, Parsons MW, Ma H, Dewey HM, Howells DW. How to make better use of thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(7):400-409
63. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet*. 2008;371(9624):1621-1623
64. Droste DW. Clinical utility of contrast-enhanced ultrasound in neurosonology. *Eur Neurol*. 2008;59(Suppl. 1):2-8
65. Droste DW, Llull JB, Pezzoli C, Bogdahn U, Kaps M. SonoVue (BR1), a new long-acting echocontrast agent, improves transcranial colour-coded duplex ultrasonic imaging. *Cerebrovasc Dis*. 2002;14(1):27-32

66. Durant TM, Oppenheimer MJ, Webster MR, Long J. Arterial air embolism. *Am Heart J.* 1949;38(4):481-500
67. Dutka AJ, Mink R, McDermott J, Clark JB, Hallenbeck JM. Effect of lidocaine on somatosensory evoked response and cerebral blood flow after canine cerebral air embolism. *Stroke.* 1992;23(10):1515-1520; Diskussion 1520-1521
68. Duverger D, Mackenzie ET. The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat – influence of strain, arterial-pressure, blood-glucose concentration, and age. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988;8(4):449-461
69. Eggers J, Koch B, Meyer K, König I, Seidel G. Effect of ultrasound on thrombolysis of middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol.* 2003;53(6):797-800
70. Eggers J, König IR, Koch B, Händler G, Seidel G. Sonothrombolysis with transcranial color-coded sonography and recombinant tissue-type plasminogen activator in acute middle cerebral artery main stem occlusion: results from a randomized study. *Stroke.* 2008;39(5):1470-1475
71. Epstein PS, Plesset MS. On the stability of gas bubbles in liquid-gas solutions. *J Chem Phys.* 1950;18:1505-1509
72. Erdem I, Yildiz S, Uzun G, Sonmez G, Senol MG, Mutluoglu M, Mutlu H, Oner B. Cerebral white-matter lesions in asymptomatic military divers. *Aviat Space Environ Med.* 2009;80(1):2–4
73. Evans DE, Kobrine AI, Weathersby PK, Bradley ME. Cardiovascular effects of cerebral air embolism. *Stroke.* 1981;12(3):338-344
74. Everbach EC, Francis CW. Cavitation mechanisms in ultrasound-accelerated thrombolysis at 1 MHz. *Ultrasound Med Biol.* 2000;26(7):1153-1160
75. Fearn SJ, Pole R, Wesnes K, Faragher EB, Hooper TL, McCollum CN. Cerebral injury during cardiopulmonary bypass: emboli impair memory. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121(6):1150-1160
76. Feinstein SB, Cheirif J, Ten Cate FJ, Silverman PR, Heidenreich PA, Dick C, Desir RM, Armstrong WF, Quinones MA, Shah PM. Safety and efficacy of a new transpulmonary ultrasound contrast agent: initial multicenter clinical results. *J Am Coll Cardiol.* 1990;16(2):316-324
77. Feinstein SB, Shah PM, Bing RJ, Meerbaum S, Corday E, Chang BL, Santillan G, Fujibayashi Y. Microbubble dynamics visualized in the intact capillary circulation. *J Am Coll Cardiol.* 1984;4(3):595-600
78. Fey K, Funk J, Tellhelm B, Schneider M. Hirninfarkt nach Coil-Embolisation der A. carotis interna zur Behandlung einer Luftsackmykose. *Tierärztl Prax.* 2007;35(G):137-141

79. Fiorelli M, Bastianello S, von Kummer R, del Zoppo GJ, Larrue V, Lesaffre E, Ringleb AP, Lorenzano S, Manelfe C, Bozzao L. Hemorrhagic transformation within 36 hours of a cerebral infarct: relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European Cooperative Acute Stroke Study I (ECASS I) cohort. *Stroke*. 1999;30(11):2280-2284
80. Fisher M, Garcia JH. Evolving stroke and the ischemic penumbra. *Neurology*. 1996;47:884-888
81. Francis CW, Blinc A, Lee S, Cox C. Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. *Ultrasound Med Biol*. 1995;21(3):419-424
82. Fritz H, Hossmann KA. Arterial air embolism in the cat brain. *Stroke*. 1979;10(5): 581-589
83. Fukaya E, Hopf HW. HBO and gas embolism. *Neurol Res*. 2007;29(2):142-145
84. Fukuda O, Endo S, Kuwayama N, Harada J, Takaku A. The characteristics of laser-Doppler flowmetry for the measurement of regional cerebral blood flow. *Neurosurgery*. 1995;36(2):358-364
85. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M, Ahuja A, Callahan F, Clark WM, Silver F, Rivera F. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *JAMA*. 1999;282(21):2003-2011
86. Furlow TW. Experimental air embolism of the brain: an analysis of the technique in the rat. *Stroke*. 1982;13(6):847-852
87. Gale T, Leslie K. Anaesthesia for neurosurgery in the sitting position. *J Clin Neurosci*. 2004;11(7):693-696
88. Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Chen S, Lian J. Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat). *Am J Pathol*. 1994;145(3):728-740
89. Garosi LS. Vestibular disease in dogs and cats. *In Practice*. 2007;29(3):151-157
90. Garosi LS, McConnell JF. Ischaemic stroke in dogs and humans: a comparative review. *J Small Anim Pract*. 2005;46(11):521-529
91. Garosi LS, McConnell, JF, Platt SR, Barone G, Baron JC, de Lahunta A, Schatzberg SJ. Results of diagnostic investigations and long-term outcome of 33 dogs with brain infarction (2002-2004). *J Vet Intern Med*. 2005;19(5):725-731
92. Gebel M, Caselitz M, Bowen-Davies PE, Weber S. A multicenter, prospective, open label, randomized, controlled phase IIIb study of SH U 508 a (Levovist) for Doppler signal enhancement in the portal vascular system. *Ultraschall Med*. 1998;19(4):148-156

93. Geraghty TE, Love S, Taylor DJ, Heller J, Mellor DJ, Hughes KJ. Assessment of subclinical venous catheter-related diseases in horses and associated risk factors. *Vet Rec.* 2009;164(8):227-231
94. Gerriets T, Li F, Silva MD, Meng X, Brevard M, Sotak CH, Fisher M. The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Methods.* 2003a;122(2):201-211
95. Gerriets T, Schwarz N, Bachmann G, Kaps M, Kloevekorn WP, Sammer G, Tschernatsch M, Nottbohm R, Blaes F, Schönburg M. Evaluation of methods to predict early long-term neurobehavioral outcome after coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol.* 2010a;105(8):1095-1101
96. Gerriets T, Schwarz N, Sammer G, Baehr J, Stolz E, Kaps M, Kloevekorn WP, Bachmann G, Schönburg M. Protecting the brain from gaseous and solid micro-emboli during coronary artery bypass grafting: a randomized controlled trial. *Eur Heart J.* 2010b;31(3):360-8
97. Gerriets T, Stolz E, König S, Babacan S, Fiss I, Jauss M, Kaps M. Sonographic monitoring of midline shift in space-occupying stroke: an early outcome predictor. *Stroke.* 2001;32(2):442-447
98. Gerriets T, Stolz E, Modrau B, Fiss I, Seidel G, Kaps M. Sonographic monitoring of midline shift in hemispheric infarctions. *Neurology.* 1999;52(1):45-49
99. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Kaps M, Bachmann G, Fisher M. Neuroprotective effects of MK-801 in different rat stroke models for permanent middle cerebral artery occlusion: adverse effects of hypothalamic damage and strategies for its avoidance. *Stroke.* 2003b;34(9):2234-2239
100. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M, Bachmann G. Noninvasive Quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke.* 2004a;35(2):566-571
101. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Kaps M, Fisher M, Bachmann G. Middle cerebral artery occlusion during MR-imaging: investigation of the hyperacute phase of stroke using a new in-bore occlusion model in rats. *Brain Res Protoc.* 2004b;12(3):137-143
102. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Rottger C, Kluge A, Kaps M, Fisher M, Bachmann G. Complications and pitfalls in rat stroke models for middle cerebral artery occlusion: a comparison between the suture and the macrosphere model using magnetic resonance angiography. *Stroke.* 2004c;35(10):2372-2377
103. Gerriets T, Tetzlaff K, Hutzelmann A, Liceni T, Kopske G, Struck N, Reuter M, Kaps M. Association between right-to-left shunts and brain lesions in sport divers. *Aviat Space Environ Med.* 2003c;74(10):1058–1060

104. Gerriets T, Walberer M, Nedelmann M, Dönges S, Ritschel N, Bachmann G, Stolz E, Kaps M, Urbanek S, Urbanek P, Schönburg M. A rat model for cerebral air microembolisation. *J Neurosci Methods*. 2010c;190(1):10-13
105. Giebler R, Kollenberg B, Pohlen G, Peters J. Effect of positive end-expiratory pressure on the incidence of venous air embolism and on the cardiovascular response to the sitting position during neurosurgery. *Br J Anaesth*. 1998;80(1):30-35
106. Gill R, Sibson NR, Hatfield RH, Burdett NG, Carpenter TA, Hall LD, Pickard JD. A comparison of the early development of ischaemic damage following permanent middle cerebral artery occlusion in rats as assessed during magnetic resonance imaging and histology. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995;15(1):1-11
107. Gillen HW. Symptomatology of cerebral gas embolism. *Neurology*. 1968;18(5):507-512
108. Gillilan LA. Blood supply to brains of ungulates with and without a rete mirabile caroticum. *J Comp Neurol*. 1974;153(3):275-290
109. Gillilan LA. Extra- and intra-cranial blood supply to brains of dog and cat. *Am J Anat*. 1976;146(3):237-253
110. Gilroy BA, Anson LW. Fatal air embolism during anesthesia for laparoscopy in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. 1987;190(5):552-554
111. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*. 1989;20(12):1627-1642
112. Giordano S, Biancari F. Does the use of carbon dioxide field flooding during heart valve surgery prevent postoperative cerebrovascular complications? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2009;9(2):323-326
113. Gonçalves R, Carrera I, Garosi L, Smith PM, McConnell JF, Penderis J. Clinical and topographic magnetic resonance imaging characteristics of suspected thalamic infarcts in 16 dogs. *Vet J*. 2011;188(1):39-43
114. Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root. *Invest Radiol*. 1968;3(5):356-366
115. Greis C. Technische Grundlagen der Kontrastsonographie im Überblick und Ausblick in die Zukunft. *Radiologe*. 2011;51(6):456-461
116. Greis C. Technology overview: SonoVue (Bracco, Milan). *Eur Radiol*. 2004;14(Suppl. 8):P11-15
117. Gunew M, Marshall R, Lui M, Astley C. Fatal venous air embolism in a cat undergoing dental extractions. *J Small Anim Pract*. 2008;49(11):601-604

118. Gupta R, Vora N, Thomas A, Crammond D, Roth R, Jovin T, Horowitz M. Symptomatic cerebral air embolism during neuro-angiographic procedures: incidence and problem avoidance. *Neurocrit Care*. 2007;7(3):241-246
119. Gurses-Özdemir Y, Yemisci M, Dalkara T. Microvascular protection is essential for successful neuroprotection in stroke. *J Neurochem*. 2012;123(Suppl. 2):2-11
120. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D, ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1317-1329
121. Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, Brott T, Frankel M, Grotta JC, Haley EC Jr, Kwiatkowski T, Levine SR, Lewandowski C, Lu M, Lyden P, Marler JR, Patel S, Tilley BC, Albers G, Bluhmki E, Wilhelm M, Hamilton S, ATLANTIS Trials Investigators; ECASS Trials Investigators; NINDS rt-PA Study Group Investigators. Association of outcome with early stroke treatment: Pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet*. 2004;363(9411):768-774
122. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Höxter G, Mahagne MH et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA*. 1995;274(13):1017-1025
123. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Dávalos A, Meier A, Meier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donnan G, Schneider D, Diez-Tejedor E, Trouillas P. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous Alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet*. 1998;352(9136):1245-1251
124. Hallenbeck JM, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Kumaroo KK, Thompson CB, Obrenovitch TP, Contreras TJ. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke*. 1986;17(2):246-253
125. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotraum*. 1994;11(2):187-196
126. Hammon JW Jr, Stump DA, Kon ND, Cordell AR, Hudspeth AS, Oaks TE, Brooker RF, Rogers AT, Hilbawi R, Coker LH, Troost BT. Risk factors and solutions for the development of neurobehavioral changes after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*. 1997;63(6):1613-1618
127. Harvey CJ, Blomley MJ, Eckersley RJ, Cosgrove DO. Developments in ultrasound contrast media. *Eur Radiol*. 2001;11(4):675-689

128. Heiss WD. The ischemic penumbra: correlates in imaging and implications for treatment of ischemic stroke. The Johann Jacob Wepfer award 2011. *Cerebrovasc. Dis.* 2011;32(4):307-320
129. Helps SC, Parsons DW, Reilly PL, Gorman DF. The effect of gas emboli on rabbit cerebral blood flow. *Stroke.* 1990;21(1):94-99
130. Heuschmann PU, Busse O, Wagner M, Endres M, Villringer A, Röther J, Kolominsky-Rabas PL, Berger K. Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Akt Neurol.* 2010;37:333-340
131. Hills BA, James PB. Microbubble damage to the blood-brain barrier: relevance to decompression sickness. *Undersea Biomed Res.* 1991;18(2):111-116
132. Hodics T, Linfante I. Cerebral air embolism. *Neurology.* 2003;60(1):112
133. Hoffman WE, Charbel FT, Edelman G, Ausman JI. Thiopental and desflurane treatment for brain protection. *Neurosurgery.* 1998;43(5):1050-1053
134. Hogue CW Jr, Murphy SF, Schechtman KB, Dávila-Román VG. Risk factors for early or delayed Stroke. *Circulation.* 1999;100(6):642-647
135. Holbrook TC, Dechant JE, Crowson CL. Suspected air embolism associated with post-anesthetic pulmonary edema and neurologic sequelae in a horse. *Vet Anaesth Analg.* 2007;34(3):217-222
136. Hossmann KA. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology.* 2008;55(3):257-270
137. Hossmann KA. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res.* 1998;39(1):106-120
138. Hossmann KA. Periarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1996;8(3):195-208
139. Hossmann KA, Fritz H. Coupling of function, metabolism, and blood flow after air embolism of the cat brain. *Adv Neurol.* 1978;20:255-262
140. Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS, O'Collins V, Sena ES, van der Worp HB, Traystman RJ, Macleod MR. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(8):1412-1431
141. Huang KL, Lin YC. Activation of complement and neutrophils increases vascular permeability during air embolism. *Aviat Space Environ Med.* 1997;68(4):300-305
142. Johansson BB. Cerebral air embolism and the blood-brain barrier in the rat. *Acta Neurol Scand.* 1980;62(4):201-209

143. Johnson-Neitman JL, O'Brien RT, Wallace JD. Quantitative perfusion analysis of the pancreas and duodenum in healthy dogs by use of contrast-enhanced ultrasonography. *Am J Vet Res.* 2012;73(3):385-392
144. Joseph RJ, Greenlee PG, Carrillo JM, Kay WJ. Canine cerebrovascular disease: clinical and pathological findings in 17 cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1988;24:569-576
145. Joyner CR Jr, Reid JM. Applications of ultrasound in cardiology and cardiovascular physiology. *Prog Cardiovasc Dis.* 1963;5:482-497
146. Joyner CR Jr, Reid JM, Bond JP. Reflected ultrasound in the assessment of mitral valve disease. *Circulation.* 1963;27(4 Pt. 1):503-511
147. Kalpokas MV, Nixon IK, Kluger R, Beilby DS, Silbert BS. Carbon dioxide field flooding versus mechanical de-airing during open-heart surgery: a prospective randomized controlled trial. *Perfusion.* 2003;18(5):291-294
148. Kanemoto H, Ohno K, Nakashima K, Takahashi M, Fujino Y, Nishimura R, Tsujimoto H. Characterization of canine focal liver lesions with contrast-enhanced ultrasound using a novel contrast agent – Sonazoid. *Vet Radiol Ultrasound.* 2009;50(2):188-194
149. Kaps M, Hansen J, Weiher M, Tiffert K, Kayser I, Droste DW. Clinically silent microemboli in patients with artificial prosthetic aortic valves are predominantly gaseous and not solid. *Stroke.* 1997;28(2):322-325
150. Kato H, Kogure K, Ohtomo H, Izumiyama M, Tobita M, Matsui S, Yamamoto E, Kohno H, Ikebe Y, Watanabe T. Characterization of experimental ischemic brain edema utilizing proton nuclear magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1986;6(2):212-221
151. Katsura K, Kristián T, Siesjö BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans.* 1994;22(4):991-996
152. Kau T, Rabitsch E, Celedin S, Habernig SM, Weber JR, Hausegger KA. When coughing can cause stroke – a case-based update on cerebral air embolism complicating biopsy of the lung. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2008;31(5):848-853
153. Klement P, Feindel CM, Scully HE, Mesher E, Klement G, Del Nido P, Wilson GJ. Mitral valve replacement in dogs. Surgical technique and postoperative management. *Vet Surg.* 1987;16(3):231-237
154. Knauth M, Ries S, Pohimann S, Kerby T, Forsting M, Daffertshofer M, Hennerici M, Sartor K. Cohort study of multiple brain lesions in sport divers: role of a patent foramen ovale. *BMJ.* 1997;314(7082):701-705
155. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke.* 1986;8:1-8

156. Kol S, Ammar R, Weisz G, Melamed Y. Hyperbaric oxygenation for arterial air embolism during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1993;55(2):401-403
157. Kotani T, Tomimura T, Ogura M, Yoshida H, Mochizuki H. Cerebral infarction caused by *Dirofilaria immitis* in three dogs. *Jpn J Vet Sci.* 1975;37(4):379-390
158. Kremkau FW, Gramiak R, Carstensen EL, Shah PM, Kramer DH. Ultrasonic detection of cavitation at catheter tips. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* 1970;110(1):177-183
159. Langheinrich AC, Leithauser B, Greschus S, Von Gerlach S, Breithecker A, Matthias FR, Rau WS, Bohle RM. Acute rat lung injury: feasibility of assessment with micro-CT. *Radiology.* 2004;233(1):165-171
160. Langheinrich AC, Yenigün M, Ostendorf A, Marhoffer S, Dierkes C, von Gerlach S, Nedelmann M, Kampschulte M, Bachmann G, Stolz E, Gerriets T. In vitro evaluation of the sinus sagittalis superior thrombosis model in the rat using 3D micro- and nanocomputed tomography. *Neuroradiology.* 2010;52(9):815-821
161. Langø T, Mørland T, Brubakk AO. Diffusion coefficients and solubility coefficients for gases in biological fluids and tissues: a review. *Undersea Hyperb Med.* 1996;23(4):247-272
162. Lansberg MG, Lee J, Christensen S, Straka M, De Silva DA, Mlynash M, Campbell BC, Bammer R, Olivot JM, Desmond P, Davis SM, Donnan GA, Albers GW. RAPID automated patient selection for reperfusion therapy: a pooled analysis of the Echoplanar Imaging Thrombolytic Evaluation Trial (EPITHET) and the Diffusion and Perfusion Imaging Evaluation for Understanding Stroke Evolution (DEFUSE) Study. *Stroke.* 2011;42(6):1608-1614
163. Larrue V, Viguier A, Arnaud C, Cognard C, Petit R, Rigal M, Cristini C. Transcranial ultrasound combined with intravenous microbubbles and tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke: a randomised controlled study. *Stroke.* 2007;38:472
164. Larrue V, von Kummer R, del Zoppo G, Bluhmki E. Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. Potential contributing factors in the European Cooperative Acute Stroke Study. *Stroke.* 1997;28(5):957-960
165. Lee RM. Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther.* 1995;66(1):149-173
166. Lee WH Jr, Hairston P. Structure effects on blood proteins at the gas-blood interface. *Fed Proc.* 1971;30(5):1615-1622
167. Leen E. Ultrasound contrast harmonic imaging of abdominal organs. *Semin Ultrasound CT MR.* 2001;22(1):11-24

168. Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, Brott TG, Toni D, Grotta JC, Albers GW, Kaste M, Marler JR, Hamilton SA, Tilley BC, Davis SM, Donnan GA, Hacke W, ECASS, ATLANTIS, NINDS and EPITHET rt-PA Study Group, Allen K, Mau J, Meier D, del Zoppo G, De Silva DA, Butcher KS, Parsons MW, Barber PA, Levi C, Bladin C, Byrnes G. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet*. 2010;375(9727):1695-1703
169. Leinonen MR, Raekallio MR, Vainio OM, O'Brien RT. Effect of anaesthesia on contrast-enhanced ultrasound of the feline spleen. *Vet J*. 2011a;190(2):273-277
170. Leinonen MR, Raekallio MR, Vainio OM, Ruohoniemi MO, Biller DS, O'Brien RT. Quantitative contrast-enhanced ultrasonographic analysis of perfusion in the kidneys, liver, pancreas, small intestine, and mesenteric lymph nodes in healthy cats. *Am J Vet Res*. 2010;71(11):1305-1311
171. Leinonen MR, Raekallio MR, Vainio OM, Sankari S, O'Brien RT. The effect of contrast-enhanced ultrasound on the kidney in eight cats. *Vet J*. 2011b;190(1):109-112
172. Leitch DR, Green RD. Pulmonary barotrauma in divers and the treatment of cerebral arterial gas embolism. *Aviat Space Environ Med*. 1986;57(10 Pt. 1) 931-938
173. Leitch DR, Hallenbeck JM. Oxygen in the treatment of spinal cord decompression sickness. *Undersea Biomed Res*. 1985;12(3):269-289
174. Levett DZ, Millar IL. Bubble trouble: a review of diving physiology and disease. *Postgrad Med J*. 2008;84(997):571-578
175. Liebeskind DS. Collateral circulation. *Stroke*. 2003;34(9):2279-2284
176. Lin TY, Chiu KM, Wang MJ, Chu SH. Carbon dioxide embolism during endoscopic saphenous vein harvesting in coronary bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126(6):2011-2015
177. Lindner JR, Song J, Jayaweera AR, Sklenar J, Kaul S. Microvascular rheology of Definity microbubbles after intra-arterial and intravenous administration. *J Am Soc Echocardiogr*. 2002;15(5):396-403
178. Liska WD, Poteet BA. Pulmonary embolism associated with canine total hip replacement. *Vet Surg*. 2003;32(2):178-186
179. Little JR, Kerr FW, Sundt TM Jr. Microcirculatory obstruction in focal cerebral ischemia. Relationship to neuronal alterations. *Mayo Clin Proc*. 1975;50(5):264-270
180. Little JR, Kerr FW, Sundt TM Jr. Microcirculatory obstruction in focal cerebral ischemia: an electron microscopic investigation in monkeys. *Stroke*. 1976;7:25-30

181. Lutz J, Hermann G. Perfluorochemicals as a treatment of decompression sickness in rats. *Pflugers Arch.* 1984;401(2):174-177
182. Lynch PR, Krasner LJ, Vinciguerra T, Shaffer TH. Effects of intravenous perfluoro-carbon and oxygen breathing on acute decompression sickness in the hamster. *Undersea Biomedical Res.* 1989;16(4):275-281
183. Ma H, Zavala JA, Teoh H, Churilov L, Gunawan M, Ly J, Wright P, Phan T, Arakawa S, Davis SM, Donnan GA. Penumbra mismatch is underestimated using standard volumetric methods and this is exacerbated with time. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(0):991-996
184. Malik AB, Johnson A, Tahamont MV. Mechanisms of lung vascular injury after intravascular coagulation. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;384:213-234
185. Manwani B, McCullough LD. Sexual dimorphism in ischemic stroke: lessons from the laboratory. *Womens Health (Lond Engl).* 2011;7(3):319-339
186. Marmottant P, Biben T, Hilgenfeldt S. Deformation and rupture of lipid vesicles in the strong shear flow generated by ultrasound-driven microbubbles. *Proc R Soc Lond.* 2008;464(2095):1781-1800
187. Marmottant P, Hilgenfeldt S: Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature.* 2003;423(6936):153-156
188. Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death. *Trends Neurosci.* 1994;17(6):251-257
189. McGrath BJ, Zimmerman JE, Williams JF, Parmet J. Carbon dioxide embolism treated with hyperbaric oxygen. *Can J Anaesth.* 1989;36:586-589
190. Meairs S. Contrast-enhanced ultrasound perfusion imaging in acute stroke patients. *Eur Neurol.* 2008;59(Suppl. 1):17-26
191. Meairs S, Alonso A, Hennerici MG. Progress in sonothrombolysis for the treatment of stroke. *Stroke.* 2012;48(6):1706-1710
192. Meairs S, Culp W. Microbubbles for thrombolysis of acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27(Suppl. 2):55-65
193. Mies G, Iijima T, Hossmann KA. Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport.* 1993;4(6):709-711
194. Miller DL, Thomas RM, Williams AR. Mechanisms for hemolysis by ultrasonic cavitation in the rotating exposure system. *Ultrasound Med Biol.* 1991;17(2):171-178

195. Mitchell SJ, Benson M, Vadlamudi L, Miller P. Cerebral arterial gas embolism by helium: an unusual case successfully treated with hyperbaric oxygen and lidocaine. *Ann Emerg Med.* 2000;35(3):300-303
196. Mitchell SJ, Gorman D. The pathophysiology of cerebral arterial gas embolism. *J Extra Corpor Technol.* 2002;34(1):18-23
197. Molina CA, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Abilleira S, Arenillas JF, Coscojuela P, Romero F, Codina A. Thrombolysis-related hemorrhagic infarction: a marker of early reperfusion, reduced infarct size, and improved outcome in patients with proximal middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 2002;33(6):1551-1556
198. Molina CA, Barreto AD, Tsivgoulis G, Sierzenski P, Malkoff MD, Rubiera M, Gonzales N, Mikulik R, Pate G, Ostrem J, Singleton W, Manvelian G, Unger EC, Grotta JC, Schellinger PD, Alexandrov AV. Transcranial ultrasound in clinical sonothrombolysis (TUCSON) trial. *Ann Neurol.* 2009;66(1):28-38
199. Molina CA, Ribo M, Rubiera M, Montaner J, Santamarina E, Delgado-Mederos R, Arenillas JF, Huertas R, Purroy F, Delgado P, Alvarez-Sabín J. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2006;37(2):425-429
200. Moon RE, de Lisle Dear G, Stolp BW. Treatment of decompression illness and iatrogenic gas embolism. *Respir Care Clin N Am.* 1999;5(1):93-135
201. Moosavi H, Utell MJ, Hyde RW, Fahey PJ, Peterson BT, Donnelly J, Jensen KD. Lung ultrastructure in non-cardiogenic pulmonary edema induced by air embolism in dogs. *Lab Invest.* 1981;45(5):456-464
202. Mori E, Yoneda Y, Tabuchi M, Yoshida T, Ohkawa S, Ohsumi Y, Kitano K, Tsutsumi A, Yamadori A. Intravenous recombinant tissue plasminogen activator in acute carotid artery territory stroke. *Neurology.* 1992;42(5):976-982
203. Morris DC, Davies K, Zhang Z, Chopp M. Measurement of cerebral microvessel diameters after embolic stroke in rat using quantitative laser scanning confocal microscopy. *Brain Res.* 2000;876(1-2):31-36
204. Murphy BP, Harford FJ, Cramer FS. Cerebral air embolism resulting from invasive medical procedures. Treatment with hyperbaric oxygen. *Ann Surg.* 1985;201(2):242-245
205. Muth CM, Shank ES. Gas embolism. *N Engl J Med.* 2000;342(7):476-482
206. Mychaskiw G 2nd, Badr AE, Tibbs R, Clower BR, Zhang JH. Optison (FS069) disrupts the blood-brain barrier in rats. *Anesth Analg.* 2000;91(4):798-803

207. Nakamura K, Sasaki N, Murakami M, Bandula Kumara WR, Ohta H, Yamasaki M, Takagi S, Osaki T, Takiguchi M. Contrast-enhanced ultrasonography for characterization of focal splenic lesions in dogs. *J Vet Int Med.* 2010;24(6):1290-1297
208. Nakamura K, Sasaki N, Yoshikawa M, Ohta H, Hwang SJ, Mimura T, Yamasaki M, Takiguchi M. Quantitative contrast-enhanced ultrasonography of canine spleen. *Vet Radiol Ultrasound.* 2009;50(1):104-108
209. Nakamura K, Takagi S, Sasaki N, Bandula Kumara WR, Murakami M, Ohta H, Yamasaki M, Takiguchi M. Contrast-enhanced ultrasonography for characterization of canine focal liver lesions. *Vet Radiol Ultrasound.* 2010b;51(1):79-85
210. Nedelmann M. Experimentelle und klinische Grundlagen der Sonothrombolyse. *Klin Neurophysiol.* 2010;41(4):263-268
211. Nedelmann M, Brandt C, Schneider F, Eicke BM, Kempfski O, Krummenauer F, Dieterich M. Ultrasound-induced blood clot dissolution without a thrombolytic drug is more effective with lower frequencies. *Cerebrovasc Dis.* 2005;20(1):18-22
212. Nedelmann M, Eicke BM, Nolle F, Lierke EG, Kempfski O. Ultraschallkontrastmittel Levovist steigert den thrombolytischen Effekt von niederfrequentem Ultraschall. *Med Klin (München).* 2002;97(4):216-220
213. Nedelmann M, Gerriets T, Kaps M. Therapeutische Ultraschallbehandlung des akuten Hirnarterienverschlusses. *Nervenarzt.* 2008a;79(12):1399-400
214. Nedelmann M, Reuter P, Walberer M, Sommer C, Alessandri B, Schiel D, Ritschel N, Kempfski O, Kaps M, Müller C, Bachmann G, Gerriets T. Detrimental effects of 60 kHz sonothrombolysis in rats with middle cerebral artery occlusion. *Ultrasound Med Biol.* 2008b;34(12):2019-2027
215. Nedelmann M, Ritschel N, Dönges S, Langheinrich AC, Acker T, Reuter P, Yenigün M, Pukropski J, Kaps M, Müller C, Bachmann G, Gerriets T. Combined contrast-enhanced ultrasound and rt-PA treatment is safe and improves impaired microcirculation after reperfusion of middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(10):1712-20
216. Nedelmann M, Schleicher N, Dönges S, Reuter P, Kaps M, Urbanek S, Schwarz N, Madlener K, Schönburg M, Urbanek P, Gerriets T. Ultrasound destruction of air microemboli as a novel approach to brain protection in cardiac surgery. *J Cardiothoracic Vasc Anesth.* Eingereicht und akzeptiert.
217. Nedelmann M, Wilhelm-Schwenkmezger T, Alessandri B, Heimann A, Schneider F, Eicke BM, Dieterich M, Kempfski O. Cerebral embolic ischemia in rats: correlation of stroke severity and functional deficit as important outcome parameter. *Brain Res.* 2007;1130(1):188-196

218. Negrin A, Gaitero L, Añor S. Presumptive caudal cerebellar artery infarct in a dog: clinical and MRI findings. *J Small Anim Pract.* 2009;50(11):615-618
219. Newman MF. Open heart surgery and cognitive decline. *Cleve Clin J Med.* 2007;74(Suppl. 1):S52-55
220. Ng WS, Rosen M. Carbon dioxide in the prevention of air embolism during open-heart surgery. *Thorax.* 1968;23(2):194-196
221. Ngai SH, Stinchfield FE, Triner L. Air embolism during total hip arthroplasties. *Anesthesiology.* 1974;40(4):405-407
222. Nyman HT, Kristensen AT, Kjølgaard-Hansen M, McEvoy FJ. Contrast-enhanced ultrasonography in normal canine liver. Evaluation of imaging and safety parameters. *Vet Radiol Ultrasound.* 2005;46(3):243-250
223. O'Brien RT. Improved detection of metastatic hepatic hemangiosarcoma nodules with contrast ultrasound in three dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2007;48(2):146-148
224. O'Brien RT, Iani M, Matheson J, Delaney F, Young K. Contrast harmonic ultrasound of spontaneous liver nodules in 32 dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2004;45(6):547-553
225. Ober CP, Spotswood TC, Hancock R. Fatal venous air embolism in a cat with a retropharyngeal diverticulum. *Vet Radiol Ultrasound.* 2006;47(2):153-158
226. Ohkuda K, Nakahara K, Binder A, Staub NC. Venous air emboli in sheep: reversible increase in lung microvascular permeability. *J Appl Physiol.* 1981;51(4):887-894
227. Ohkuda K, Nakahara K, Weinder WJ, Binder A, Staub NC. Lung fluid exchange after uneven pulmonary artery obstruction in sheep. *Circ Res.* 1978;43(2):152-161
228. Ohlerth S, Dennler M, Rüefli E, Hauser B, Poirier V, Siebeck N, Roos M, Kaser-Hotz B. Contrast harmonic imaging characterization of canine splenic lesions. *J Vet Intern Med.* 2008;22(5):1095-1102
229. Ohlerth S, O'Brien RT. Contrast ultrasound: general principles and veterinary clinical applications. *Vet J.* 2007;174(3):501-512
230. Ohlerth S, Rüefli E, Poirier V, Roos M, Kaser-Hotz B. Contrast harmonic imaging of the normal canine spleen. *Vet Radiol Ultrasound.* 2007;48(5):451-456
231. Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, del Zoppo GJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke.* 1994;25(9):1847-1853, Diskussion: 1853-1854
232. Okamoto K. Spontaneous hypertension in rats. *Int Rev Exp Pathol.* 1969;7:227-270

233. Okamoto K, Yamori Y, Nagaoka A. Establishment of the stroke-prone spontaneously rat (SHR). *Circ Res.* 1974;34-35(Suppl. 1):143-153
234. Pacifico N, Weishaar KM, Boozer LB, Nakamura RK. Full recovery after cardiac arrest secondary to accidental iatrogenic venous air embolism in a cat. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2010;20(2):264-267
235. Patel PM, Drummond JC, Cole DJ, Kelly PJ, Watson M. Isoflurane and pentobarbital reduce the frequency of transient ischemic depolarizations during focal ischemia in rats. *Anesth Analg.* 1998;86(4):773-780
236. Peirce EC 2nd. Cerebral gas embolism (arterial) with special reference to iatrogenic accidents. *HBO Review.* 1980a;1:161-184
237. Peirce EC 2nd. The therapy for arterial air embolism. *Ann Thorac Surg.* 1980b;29(4):300-303
238. Perren F, Loulidi J, Poglia D, Landis T, Sztajzel R. Microbubble potentiated transcranial duplex ultrasound enhances IV thrombolysis in acute stroke. *J Thromb Thrombolysis.* 2008;25(2):219-223
239. Perthel M, Kseibi S, Bendisch A, Laas J. Use of a dynamic bubble trap in the arterial line reduces microbubbles during cardiopulmonary bypass and microembolic signals in the middle cerebral artery. *Perfusion.* 2005;20(3):151-156
240. Petit B, Gaud E, Colevret D, Arditi M, Yan F, Tranquart F, Allémann E. In vitro sonothrombolysis of human blood clots with BR38 microbubbles. *Ultrasound Med Biol.* 2012;38(7):1222-1233
241. Petts JS, Presson RG Jr. A review of the detection and treatment of venous air embolism. *Anesthesiol Rev.* 1992;19(4):13-21
242. Platt SR, Garosi L. Canine cerebrovascular disease: do dogs have strokes? *J Am Anim Hosp Assoc.* 2003;39(4):337-34
243. Porter JM, Pidgeon C, Cunningham AJ. The sitting position in neurosurgery: a critical appraisal. *Br J Anaesth.* 1999;82(1):117-128
244. Postema M, Gilja OH. Contrast-enhanced and targeted ultrasound. *World J Gastroenterol.* 2011;17(1):28-41
245. Pranghofer S. "It could be seen more clearly in unreasonable animals than in humans": the representation of the rete mirabile in early modern anatomy. *Med Hist.* 2009;53(4):561-586
246. Price RJ, Skyba DM, Kaul S, Skalak TC. Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *Circulation.* 1998;98(13):1264-1267

247. Prokop AF, Soltani A, Roy RA. Cavitation mechanisms in ultrasound-accelerated fibrinolysis. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33(6):924–933
248. Pugsley W, Klinger L, Paschalis C, Treasure T, Harrison M, Newman S. The impact of microemboli during cardiopulmonary bypass on neuropsychological functioning. *Stroke.* 1994;25(7):1393-1399
249. Pusterla N, Braun U. Prophylaxis of intravenous catheter-related thrombophlebitis in cattle. *Vet Rec.* 1996;139(12):287-289
250. Qiu F, Peng S, Kunselman A, Ündar A. Evaluation of Capiiox FX05 oxygenator with an integrated arterial filter on trapping gaseous microemboli and pressure drop with open and closed purge line. *Artif Organs.* 2010;34(11):1053-1057
251. Quast MJ, Huang NC, Hillman GR, Kent TA. The evolution of acute stroke recorded by multimodal magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging.* 1993;11(4):465-471
252. Rademacher N, Ohlerth S, Scharf G, Lalahova D, Sieber-Ruckstuhl N, Alt M, Roos M, Grest P, Kaser-Hotz B. Contrast-enhanced power and color Doppler ultrasonography of the pancreas in healthy and diseased cats. *J Vet Intern Med.* 2008;22(6):1310-1316
253. Ralph AG, Brainard BM. Update on disseminated intravascular coagulation: when to consider it, when to expect it, when to treat it. *Top Companion Anim Med.* 2012;27(2):65-72
254. Rasool N, Farouqi M, Rubinstein EH. Lidocaine accelerates neuroelectrical recovery after incomplete global ischemia in rabbits. *Stroke.* 1990;21(6):929-935
255. Reimer SB, Kittleson MD, Kyles AE. Use of rheolytic thrombectomy in the treatment of feline distal aortic thromboembolism. *J Vet Intern Med.* 2006;20(2):290-296
256. Ritter LS, Orozco JA, Coull BM, McDonagh PF, Rosenblum WI. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke. *Stroke.* 2000;31(5):1153-1161
257. Ritz-Timme S, Eckelt N, Schmidtke E, Thomsen H. Genesis and diagnostic value of leukocyte and platelet accumulations around “air bubbles” in blood after venous air embolism. *Int J Legal Med.* 1998;111(1):22-26
258. Roach GW, Kanchuger M, Mangano CM, Newman M, Nussmeier N, Wolman R, Aggarwal A, Marschall K, Graham SH, Ley C. Adverse cerebral outcomes after coronary bypass surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group and the Ischemia Research and Education Foundation Investigators. *N Engl J Med.* 1996;335(25):1857-1863

259. Roessler FC, Ohlrich M, Marxsen JH, Schmieger M, Weber PK, Stellmacher F, Trillenber P, Eggert J, Seidel G. Introduction of a new model for time-continuous and non-contact investigations of in-vitro thrombolysis under physiological flow conditions. *BMC Neurol.* 2011a;11:58
260. Roessler FC, Ohlrich M, Marxsen JH, Stellmacher F, Sprenger A, Dempfle CE, Seidel G. The platelet-rich plasma clot: a standardized in-vitro clot formation protocol for investigations of sonothrombolysis under physiological flows. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2011b;22(5):407-415
261. Romero JR, Pikula A, Nguyen TN, Nien YL, Norbash A, Babikian VL. Cerebral collateral circulation in carotid artery disease. *Curr Cardiol Rev.* 2009;5(4):279-288
262. Rooney JA. Hemolysis near an ultrasonically pulsating gas bubble. *Science.* 1970; 169(3948):869-871
263. Rossi F, Leone VF, Vignoli M, Laddaga E, Terragni R. Use of contrast-enhanced ultrasound for characterization of focal splenic lesions. *Vet Radiol Ultrasound.* 2008;49(2):154-164
264. Ryu KH, Hindman BJ, Reasoner DK, Dexter F. Heparin reduces neurological impairment after cerebral arterial air embolism in the rabbit. *Stroke.* 1996;27(2):303-309, Diskussion: 310
265. Sauren LD, la Meir M, Bolotin G, van der Veen FH, Heijmans JH, Mess WH, Maessen JG. The EmBlocker: efficiency of a new ultrasonic embolic protection device adjunctive to heart valve surgery. *Ann Thorac Surg.* 2009;88(1):253-257
266. Sauren LD, la Meir M, Palmén M, Severdija E, van der Veen FH, Mess WH, Maessen JG. New ultrasonic radiation reduces cerebral emboli during extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007;32(2):274-280
267. Saver JL. Improving reperfusion therapy for acute ischaemic stroke. *J Thromb Haemost.* 2011;9(Suppl. 1):333-343
268. Schlinkert RT, Chapman TP. Nitrogen embolus as a complication of hepatic cryosurgery. *Arch Surg.* 1990;125(9):1214
269. Schmidt-Elsässer R, Zausinger S, Hungerhuber E, Bähmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia. Evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke.* 1998;29(10):2162-2170
270. Schneider M, Anantharam B, Arditi M, Bokor D, Broillet A, Bussat P, Fouillet X, Frinking P, Tardy I, Terrettaz J, Senior R, Tranquart F. BR38, a new ultrasound blood pool agent. *Invest Radiol.* 2011;46(8):486-494.

271. Schönburg M, Kraus B, Mühling A, Taborski U, Hofmann H, Erhardt G, Hein S, Roth M, Vogt PR, Karliczek GF, Kloeve Korn WP. The dynamic air bubble trap reduces cerebral microembolism during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126(5):1455-1460
272. Schönburg M, Urbanek P, Erhardt G, Kraus B, Taborski U, Mühling A, Hein S, Roth M, Tiedtke HJ, Klöve Korn WP. Significant reduction of air microbubbles with the dynamic bubble trap during cardiopulmonary bypass. *Perfusion.* 2001;16(1):19-25
273. Schönburg M, Ziegelhöffer T, Kraus B, Mühling A, Heidt M, Taborski U, Gerriets T, Roth M, Hein S, Urbanek S, Kloeve Korn WP. Reduction of gaseous microembolism during aortic valve replacement using a dynamic bubble trap. *Gen Physiol Biophys.* 2006;25(2):207-214
274. Schoeman JP. Feline distal aortic thromboembolism: a review of 44 cases (1990-1998). *J Feline Med Surg.* 1999;1(4):221-231
275. Seega J, Elger B. Diffusion- and T2-weighted imaging: evaluation of oedema reduction in focal cerebral ischaemia by the calcium and serotonin antagonist levemopamil. *Magn Reson Imaging.* 1993;11(3):401-409
276. Sibai AN, Baraka A, Moudawar A. Hazards of nitrous oxide administration in presence of venous air embolism. *Middle East J Anesthesiol.* 1996;13(6):565-571
277. Siddiqi F, Odriljin TM, Fay PJ, Cox C, Francis CW. Binding of tissue-plasminogen activator to fibrin: effect of ultrasound. *Blood.* 1998;91(6):2019-2025
278. Skidmore KL, Jones C, DeWet C. Flooding the surgical field with carbon dioxide during open heart surgery improves segmental wall motion. *J Extra Corpor Technol.* 2006;38(2):123-127
279. Small DL, Buchan AM. Animal models. *Br Med Bull.* 2000;56(2):307-17.
280. Söhle M, Heimann A, Kempfski O. On the number of measurement sites required to assess regional cerebral blood flow by laser-Doppler scanning during cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci Methods.* 2001;110(1-2):91-94.
281. Spahn DR. Current status of artificial oxygen carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000; 40(3):143-151
282. Spiess BD, McCarthy RJ, Tuman KJ, Woronowicz AW, Tool KA, Ivankovich AD. Treatment of decompression sickness with a perfluorocarbon emulsion (FC-43). *Undersea Biomed Res.* 1988;15(1):31-37
283. Staffieri F, Lacitignola L, De Siena R, Crovace A. A case of spontaneous venous embolism with carbon dioxide during laparoscopic surgery in a pig. *Vet Anaesth Analg.* 2007;34(1):63-66

284. Starritt HC, Duck FA, Humphrey VF. Forces acting in the direction of propagation in pulsed ultrasound fields. *Phys Med Biol.* 1991;36(11):1465-1474
285. Stewart VR, Sidhu PS. New directions in ultrasound: microbubble contrast. *Br J Radiol.* 2006;79(939):188-194
286. Stolz E, Gerriets T, Fiss I, Babacan SS, Seidel G, Kaps M. Comparison of transcranial color-coded duplex sonography and cranial CT measurements for determining third ventricle midline shift in space-occupying stroke. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1999;20(8):1567-1571
287. Stride E. Physical principles of microbubbles for ultrasound imaging and therapy. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27(Suppl. 2):1-13
288. Stump DA, Rogers AT, Hammon JW, Newman SP. Cerebral emboli and cognitive outcome after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1996;10(1):113-119
289. Svenarud P, Persson M, van der Linden J. Effect of CO₂ insufflation on the number and behavior of air microemboli in open-heart surgery: a randomized clinical trial. *Circulation.* 2004;109(9):1127-1132
290. Tachibana K, Tachibana S. Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation.* 1995;92(5):1148-1150
291. Taeymans O, Penninck D. Contrast enhanced sonographic assessment of feeding vessels as a discriminator between malignant vs. benign focal splenic lesions. *Vet Radiol Ultrasound.* 2011;52(4):457-461
292. Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG, Gibson DG 3rd, Fisher M. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats. *J Neurol Sci.* 1997;153(1):8-11
293. Taylor KM. Brain damage during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1998;65(4 Suppl.):S20-26, Diskussion: S27-28
294. Thayer GW, Carrig CB, Evans AT. Fatal venous air embolism associated with pneumocystography in a cat. *J Am Vet Med Assoc.* 1980;176(7):643-645
295. Thorsen T, Dalen H, Bjerkvig R, Holmsen H. Transmission and scanning electron microscopy of N₂ microbubble-activated human platelets in vitro. *Undersea Biomed Res.* 1987;14(1):45-58
296. Thorsen T, Klausen H, Lie RT, Holmsen H. Bubble-induced aggregation of platelets: effects of gas species, proteins, and decompression. *Undersea Hyperb Med.* 1993;20(2):101-119

297. Thrift AG, Dewey HM, Macdonell RA, McNeil JJ, Donnan GA. Incidence of the major stroke subtypes: initial findings from the North East Melbourne stroke incidence study (NEMESIS). *Stroke*. 2001;32(8):1732-1738
298. Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric-oxygen therapy. *New Engl J Med*. 1996;334(25):1642-1648
299. Toomey JR, Valocik RE, Koster PF, Gabriel MA, McVey M, Hart TK, Ohlstein EH, Parsons AA, Barone FC. Inhibition of factor IX(a) is a protective in a rat model of thromboembolic stroke. *Stroke*. 2002;33(2):578-585
300. Townsley MI, Parker JC, Longenecker GL, Perry ML, Pitt RM, Taylor AE. Pulmonary embolism: analysis of endothelial pore sizes in canine lung. *Am J Physiol*. 1988;255(5 Pt. 2):H1075-1083
301. Trübestein G, Engel C, Etzel F, Sobbe A, Cremer H, Stumpff U. Thrombolysis by ultrasound. *Clin Sci Mol Med Suppl*. 1976;3:697-698
302. van Hulst RA, Klein J, Lachmann B. Gas embolism: pathophysiology and treatment. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2003;23(5):237-246
303. Voigt JU. Ultrasound molecular imaging. *Methods*. 2009;48(2):92-97
304. Walberer M, Blaes F, Stolz E, Müller C, Schönburg M, Tschernatsch M, Bachmann G, Gerriets T. Midline-shift corresponds to the amount of brain edema early after hemispheric stroke – an MRI study in rats. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2007;19(2):105-110
305. Walberer M, Stolz E, Müller C, Friedrich C, Rottger C, Blaes F, Kaps M, Fisher M, Bachmann G, Gerriets T. Experimental stroke: ischaemic lesion volume and oedema formation differ among rat strains (a comparison between Wistar and Sprague-Dawley rats using MRI). *Lab Anim*. 2006;40(1):1-8
306. Walsh VP, Machon RG, Munday JS, Broome CJ. Suspected fatal venous air embolism during anaesthesia in a Pomeranian dog with pulmonary calcification. *N Z Vet J*. 2005;53(5):359-362
307. Wang CX, Yang T, Shuaib A. An improved version of embolic model of brain ischemic injury in the rat. *J Neurosci Methods*. 2001;109(2):147-151
308. Ward CA, Koheil A, McCullough D, Johnson WR, Fraser WD. Activation of complement at plasma-air or serum-air interface of rabbits. *J Appl Physiol*. 1986;60(5):1651-1658
309. Ward CA, McCulloch D, Yee D, Stanga D, Fraser WD. Complement activation involvement in decompression sickness of rabbits. *Undersea Biomed Res*. 1990;17(1):51-66
310. Ward M, Wu JR, Chiu JF. Ultrasound-induced cell lysis and sonoporation enhanced by contrast agents. *J Acoust Soc Am*. 1999;105(5):2951-2957

311. Warren BA, Philp RB, Inwood MJ. The ultrastructural morphology of air embolism: platelet adhesion to the interface and endothelial damage. *Br J Exp Pathol.* 1973; 54(2):163-172
312. Weenink RP, Hollmann MW, van Hulst RA. Animal models of cerebral arterial gas embolism. *J Neurosci Methods.* 2012;205(2):233-245
313. Weissman A, Kol S, Peretz BA. Gas embolism in obstetrics and gynaecology: a review. *J Reprod Med.* 1996;41(2):103-111
314. Wells PN. Ultrasonic imaging of the human body. *Rep Prog Phys.* 1999;62:671-722
315. WHO MONICA Project Principal Investigators. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. *J Clin Epidemiol.* 1988;41(2):105-114
316. Wiedemair W, Tuković Z, Jasak H, Poulikakos D, Kurtcuoglu V. On ultrasound-induced microbubble oscillation in a capillary blood vessel and its implications for the blood-brain barrier. *Phys Med Biol.* 2012;57(4):1019-1045
317. Wilhelm-Schwenkmezger T, Pittermann P, Zajonz K, Kempinski O, Dieterich M, Nedelmann M. Therapeutic application of 20-kHz transcranial ultrasound in an embolic middle cerebral artery occlusion model in rats: safety concerns. *Stroke.* 2007;38(3):1031-1035
318. Williams DJ, Doolette DJ, Upton RN. Increased cerebral blood flow and cardiac output following cerebral arterial air embolism in sheep. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001;28(11):868-872
319. Woitzik J, Schilling L. Control of completeness and immediate detection of bleeding by a single laser-Doppler flow probe during intravascular middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Meth.* 2002;122(1):75-78
320. Wunderlich MT, Görtler M, Postert T, Schmitt E, Seidel G, Gahn G, Samii C, Stolz E; Duplex Sonography in Acute Stroke (DIAS) Study Group; Competence Network Stroke. Recanalization after intravenous thrombolysis: does a recanalization time window exist? *Neurology.* 2007;68(17):1364-1368
321. Zhang RL, Chopp M, Zhang ZG, Jiang Q, Ewing JR. A rat model of focal embolic cerebral ischemia. *Brain Res.* 1997;766(1-2):83-92
322. Zhang ZG, Chopp M, Goussev A, Lu D, Morris D, Tsang W, Powers C, Ho KL. Cerebral microvascular obstruction by fibrin is associated with upregulation of PAI-1 acutely after onset of focal embolic ischemia in rats. *J Neurosci.* 1999;19(24):10898–10907

IX Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%HLV	prozentuales hemisphärisches Läsionsvolumen
%HLV _{ec}	prozentuales ödemkorrigiertes, hemisphärisches Läsionsvolumen
xG	g-Kraft, Erdbeschleunigung; $g \approx 9,81 \text{ m/s}^2$
A.	lat. Arteria (Arterie)
Aa.	lat. Arteriae (Arterien)
ACA	vordere Zerebralarterie, lat. A. cerebri anterior/rostralis
ACC	Halsschlagader, lat. A. carotis communis
ACE	äußere Halsschlagader, lat. A. carotis externa
ACI	innere Halsschlagader, lat. A. carotis interna
ACM	mittlere Zerebralarterie, lat. A. cerebri media
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Basenabweichung, engl. base excess
BGBI	Bundesgesetzblatt
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bpu	engl. blood perfusion unit
c-	Zenti-
CT	Computertomograf
Dr.	Doktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. desoxyribonucleic acid
e.g.	zum Beispiel, lat. exempli gratia, engl. for example
engl.	englisch
et al.	und Mitarbeiter, lat. et alii (wörtliche Übersetzung: und andere)
FOV	engl. Field of View
g	Gramm
GG	Grundgesetz
Gl.	lat. Glandula (Drüse)
GME	zerebrale Gasmikroembolisation, engl. cerebral gaseous microembolization

GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde – Society for Laboratory Animal Science
h	Stunde
HV _c	Volumen der kontralateralen Hemisphäre, engl. contralateral hemispheric volume
HV _i	Volumen der ipsilateralen Hemisphäre, engl. ipsilateral hemispheric volume
Hz	Hertz
i.d.	Innendurchmesser, engl. inner diameter
ICP	intrakranieller Druck, engl. intracranial pressure
IE	Internationale Einheit
k-	Kilo-
l	Liter
lat.	lateinisch
LV	Läsionsvolumen, engl. lesion volume
μ-	Mikro-
m	Meter
M	Molar
m-	Milli-
M-	Mega-
M.	lat. Musculus (Muskel)
MCAO	Okklusion der mittleren Zerebralarterie, engl. middle cerebral artery occlusion
MI	mechanischer Index
min	Minute
MLS	Mittellinienverlagerung, engl. midline shift
mm ³	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule, Druckeinheit
MRT	Magnetresonanztomograf
MWU	Mann-Whitney-U-Test
n-	Nano-
N.	lat. Nervus (Nerv)
Nr.	Nummer
o.d.	Außendurchmesser, engl. outer diameter

pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PE	Polyethylen
pH	pH-Wert, potentia Hydrogenii
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Prof.	Professor
PRP	thrombozytenreiches Plasma, engl. platelet rich plasma
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon)
RARE	engl. Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement
rCBF	regionaler zerebraler Blutfluss, engl. regional Cerebral Blood Flow
ROI	engl. Region of Interest
rpm	Runden pro Minute
rt-PA	rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator, auch: Alteplase; engl. recombinant tissue-type plasminogen activator
S.	Seite
s.c.	subkutan
SAB	Subarachnoidalblutung
sec	Sekunde
SHR	spontan hypertensive Ratte
sO ₂	Sauerstoffsättigung
T	Tesla
Tab.	Tabelle
TE	Echozeit
tHb	totales Hämoglobin
TIA	transitorische ischämische Attacke
TierSchG	Tierschutzgesetz
TR	Repetitionszeit
V.	lat. Vena (Vene)
Vol.-%	Volumenprozent
vs.	versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. World Health Organization
WU	Wistar-Unilever-Ratte

2. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2-1, S. 21: Zeitlicher Ablauf der Hauptpathomechanismen in der neurochemischen Kaskade nach ischämischem Schlaganfall (nach Dirnagl et al., 1999)
- Abb. 3-1, S. 40: Mäanderförmige rCBF-Messung an fünfzehn Punkten auf der Knochenlamelle
- Abb. 3-2, S. 42: Schnitt am ventralen Halsbereich der Ratte mit anschließender stumpfer Trennung der Speicheldrüsen und ventralen Halsmuskeln
- Abb. 3-3, S. 42: Von Bindegewebe, Nerven (↑) und kleineren Gefäßgeflechten (*) umgebene, rechte Karotisbifurkation
- Abb. 3-4, S. 43: Skelettierte rechte Karotisbifurkation mit Darstellung der Äste der A. carotis externa; (1) A. carotis communis, (2) A. carotis interna, (3) A. carotis externa, (4) A. occipitalis, (5) A. thyroidea superficialis
- Abb. 3-5, S. 44: Basale intrazerebrale Gefäßanatomie mit Blick auf den Circulus arteriosus cerebri (Willisii) der Ratte mit Okklusion der A. cerebri media durch das Fadenköpfchen, schematische Darstellung (A) und Fotografie (B); (1) A. cerebri media, (2) A. cerebri anterior/rostralis, (3) A. cerebri posterior/caudalis, (4) A. carotis interna, (5) A. basilaris, (6) Faden
- Abb. 3-6, S. 47: Kaudalverlagerter Stumpf der A. carotis externa; (1) A. carotis communis, (2) A. carotis interna, (3) kaudalverlagerter Stumpf der A. carotis externa, (4) ligierte A. pterygopalatina
- Abb. 3-7, S. 48: Wiederhergestellter Blutfluss in der A. carotis communis und der A. carotis interna; die A. carotis externa ist nur noch als kleiner Stumpf sichtbar; (1) A. carotis communis, (2) A. carotis interna, (3) ligierter Stumpf der A. carotis externa
- Abb. 3-8, S. 51: Schematische Darstellung der Konstruktion zur Gasbläscherzeugung und des Dreivegehahnes für die Umstellung zwischen Druckausgleichsbeutel und Studientier (modifiziert nach Gerriets et al., 2010c)
- Abb. 3-9, S. 53: Sonos® 7500 (A) und 3 MHz-Farbduplexsonde (B)
- Abb. 3-10, S. 54: Schematische Darstellung (A), Ultraschallbild (B; modifiziert nach Nedelmann et al., 2010) und Fotografie (C) der Behandlung mit Ultraschall
- Abb. 3-11, S. 62: Messung der Flächen der kontra- und ipsilateralen Hemisphäre sowie des Infarktes
- Abb. 3-12, S. 63: Ipsi- (A) und kontralaterale (B) Messung des Abstandes zwischen Kortextrand und Mittellinie

- Abb. 3-13, S. 65: Schematische Darstellung der Microfil®-Applikation in den Aortenbogen, die angebrachten Ligaturen der Gefäßabgänge sind als solche kenntlich gemacht
- Abb. 3-14, S. 66: Basale Ansicht auf ein Rattengehirn, dessen Gefäßsystem mit Microfil® gefüllt ist; (1) A. cerebri media, (2) A. cerebri anterior/rostralis, (3) A. cerebri posterior/caudalis, (4) A. carotis interna, (5) A. basilaris
- Abb. 3-15, S. 67: Darstellung des kompletten Gehirns (A) und des Teilstücks des Stromgebietes der A. cerebri media (B) mit dem Mikro-CT
- Abb. 3-16, S. 68: Regions of Interest im Stromgebiet der A. cerebri media
- Abb. 3-17, S. 69: Studienablauf Experiment I
- Abb. 3-18, S. 71: Zeitlicher Ablauf der 60-minütigen Therapie (↑ BR1/BR38, * rt-PA, ↔ 3 MHz Ultraschall)
- Abb. 3-19, S. 73: Studienablauf Experiment II
- Abb. 3-20, S. 75: Studienablauf Experiment III
- Abb. 4-1, S. 81: Grafische Darstellung der Laser-Doppler-Messungen (rCBF Baseline = 100%)
- Abb. 4-2, S. 82: Grafische Darstellung der Laser-Doppler-Messungen (rCBF post Reperfusion = 100%)
- Abb. 4-3, S. 85: Grafische Darstellung des totalen Gefäßvolumens der rechten Hemisphäre (in % der linken, gesunden Hemisphäre)
- Abb. 4-4, S. 86: SAB einer SHR aus der Kontrollgruppe (A) und einer SHR aus der Mikrobläschengruppe (B)
- Abb. 4-5, S. 87: Grafische Darstellung der Laser-Doppler-Messungen (rCBF Baseline = 100%)
- Abb. 4-6, S. 88: Grafische Darstellung der Laser-Doppler-Messungen (rCBF prä Therapie = 100%)
- Abb. 4-7, S. 90: Blick von basal auf den mit Microfil® gefüllten Circulus arteriosus cerebri (Willisii) der 31 Studientiere; der mit Evans Blau gefärbte PRP-Thrombus ist bei jedem Tier außer C-04 gut zu erkennen (A: Kontrollgruppe, B: rt-PA-Gruppe, C: BR38-Gruppe)
- Abb. 4-8, S. 91: Blick auf die linke und die rechte Hemisphäre von jeweils lateral. Die mit Microfil® gefüllten zerebralen Gefäße der 31 Studientiere sind gut zu erkennen, ungefähr mittig verläuft die ACM; der mit Evans Blau gefärbte PRP-Thrombus liegt bei einigen Tieren tief distal in der ACM, bei einigen Tieren ist er nicht zu sehen (A: Kontrollgruppe, B: rt-PA-Gruppe, C: BR38-Gruppe)

Abb. 4-9, S. 95: Verlauf des Neuroscores (A) und der Rotarod-Laufleistungen (B) in Experiment III

Abb. 4-10, S. 97: Mittellinienverlagerung (MLS) und prozentuales ödemkorrigiertes Läsionsvolumen (%HLV_{ec}) der Gruppen B (Kleine Bläschen) und C (Große Bläschen)

3. Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1, S. 15:	Auswahl an Ultraschallkontrastverstärkern und ihre Zusammensetzung
Tab. 3-1, S. 56:	Eigenschaften der Mikrobläschenpräparate BR1 und BR38
Tab. 3-2, S. 58:	Kurzbeschreibung der Elemente des Neuroscores
Tab. 3-3, S. 70:	Studiengruppeneinteilung Experiment I
Tab. 3-4, S. 73:	Studiengruppeneinteilung Experiment II
Tab. 3-5, S. 76:	Studiengruppeneinteilung Experiment III
Tab. 4-1, S. 79:	Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen in Experiment I
Tab. 4-2, S. 80:	Anzahl der aus Experiment I ausgeschlossenen Tiere und Ausschlussgründe
Tab. 4-3, S. 81:	Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen (Wert Baseline = 100%)
Tab. 4-4, S. 82:	Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen (Werte post Reperfusion = 100%)
Tab. 4-5, S. 84:	Absolute Gefäßvolumina der Kortex- und Striatumseiten sowie totales Gefäßvolumen der beiden Hemisphären; absolutes Gefäßvolumen der linken, gesunden Seite = 100%
Tab. 4-6, S. 85:	Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen in Experiment II
Tab. 4-7, S. 87:	Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen (Wert Baseline = 100%)
Tab. 4-8, S. 88:	Ergebnisse der Laser-Doppler-Messungen (Werte prä Therapie = 100%)
Tab. 4-9, S. 89:	Makroskopische Befunde der <i>post mortem</i> -Gehirnanalyse in Experiment II; (1) Tiere mit Thrombus in der ACI oder der ACI und den proximalen Anteilen der ACA und/oder der ACM, (2) Tiere mit Thrombus in den proximalen Anteilen der ACA und/oder der ACM ohne Beteiligung der ACI, (3) Tiere, bei denen der Thrombus in der lateralen Ansicht sichtbar ist
Tab. 4-10, S. 92:	Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen in Experiment III
Tab. 4-11, S. 93:	Parameter der Luftbläscheneinleitung
Tab. 4-12, S. 94:	Neuroscore und Rotarod-Laufleistungen in Experiment III
Tab. 4-13, S. 94:	Signifikanzniveau p in der post-hoc Analyse mit dem Mann-Whitney-U-Test bei der Rotarod-Laufleistung nach 4h und 24h der Gruppen im Vergleich (vs.: versus)

- Tab. 5-1, S. 117: Beispiele für die Verwendung von Echokontrastverstärkern in der veterinärmedizinischen Ultraschalldiagnostik
- Tab. 5-2, S.124: Volumina und Oberflächengrößen der Bläschen (Formeln zur Bestimmung (a) des Kugelvolumens: $V = 1/6 * \pi * d^3$, (b) des Gesamtvolumens = Anzahl der Bläschen * V; (c) der Kugeloberfläche: $A = \pi * d^2$, (d) der Gesamtoberfläche = Anzahl der Bläschen * A)

4. Materialien

1.1 Versuchstiere

- 8 bis 10 Wochen alte, männliche Wistar-Unilever-Ratten (HsdCpb:WU) mit einem Gewicht zwischen 275 und 350 g von Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland
- 15 bis 21 Wochen alte, männliche spontan hypertensive Ratten (SHR/NHsd) mit einem Gewicht zwischen 290 und 375 g von Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland
- Altromin® Haltungsdiät Ratten/Mäuse, speziell behandelt, Alleinfuttermittel für Versuchstiere von Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland
- Lignocel® Hygienic Animal bedding von J. Rettenmayer und Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland

1.2 Medikamente

- Actilyse® (Wirkstoff: Alteplase (rt-PA)) von Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland
- Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Wirkstoff: Dexpanthenol) von Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
- BR38 (35% C₄F₁₀/65% N₂-Mikrogasbläschen mit Phospholipidhülle) von Bracco Research S.A., Plan-les-Ouates, Genf, Schweiz
- Ecoflac® plus – Isotone Kochsalzlösung 0,9% Braun (Wirkstoff: Natriumchlorid) von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Forene® (Wirkstoff: Isofluran) von Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
- Heparin-Natrium Braun 2500 IE/5 ml (Wirkstoff: Heparin-Natrium) von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Rimadyl® Injektionslösung für Hunde und Katzen (Wirkstoff: Carprofen) von Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland
- SonoVue® (BR1; SF₆-Mikrogasbläschen mit Phospholipidhülle) von Bracco Research S.A., Plan-les-Ouates, Genf, Schweiz
- Weißes Vaseline Lichtenstein DAB von Winthrop Arzneimittel GmbH, Mülheim-Kärlich, Deutschland
- Xylocain® 2% Injektionslösung (Wirkstoff: Lidocain) von AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland

1.3 Chemikalien und Lösungsmittel

- 2-Propanol 70% rein von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Ecoflac® plus – Isotone Kochsalzlösung 0,9% Braun (Wirkstoff: Natriumchlorid) von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Fluka® Evans Blau (Tetrasodium 6,6'-((3,3'-dimethyl-(1,1'-biphenyl-4,4'-diyl)bis(azo)bis(4-amino-5-hydroxy-1,3-naphthalenedisulphonat)) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Flusssäure (HF, Fluorwasserstoffsäure) von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Kalziumchlorid (CaCl₂) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Kodan® Tinktur forte (Isopropylalkohol, Propan-1-ol, Biphenyl-2-ol) von Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
- Microfil® (MV-122 yellow, MV Diluent, MV Curing Agent; bleihaltiges Röntgenkontrastmittel) von Flow Tech Inc., Carver, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- 3,2% Natriumcitrat (C₆H₅Na₃O₇) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Provil® novo, Light Base & Light Catalyst (Zweikomponenten-Silikon) von Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland
- Roti®-Histofix 4% (Formaldehydlösung) von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Ultraschallgel Sonosid® von Asid Bonz GmbH, Herrenberg, Deutschland

1.4 Operationszubehör

- Handschuhe Vasco® Sensitive, Größe M von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Kanülen:
 - o Sterican® 23G x 1 ¼“ (blau) von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Katheter:
 - o Intramedic® PE-50-Katheter, i.d. 0,53 mm, o.d. 0,965 mm von Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
 - o SAI PE-8-Katheter, i.d. 0,20 mm, o.d. 0,36 mm von Strategic Applications Inc., Lake Villa, Illinois, Vereinigte Staaten
 - o PTFE-Chemieschlauch, natur (Teflonkatheter), i.d. 0,5 mm, o.d. 0,78 mm von Reichelt Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland
- Labortimer von Abcam plc, Cambridge, England

- Leukofix® von BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
- Leukosilk® von BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
- Lineal „bsbtimer“ von bsb-obpacher GmbH, Steinhagen, Deutschland
- Medicomp® Vliesstoffkompressen von Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
- Nahtmaterial von Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
 - o Ethicon® 0 Perma-Hand-Seide® (680H) (Hautnähte)
 - o Ethicon® 4-0 Perma-Hand-Seide® (EH6722E) (Ligaturen im Tier)
- Retransfusionsbeutel, 160 cm, 1000 ml von free life GmbH, Aachen, Deutschland
- Rotilabo®-Spritzenfilter steril, 45 µm von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Skalpellklingen Nr. 15, Sterile Surgical Blades von Aesculap Division B. Braun, Tuttlingen, Deutschland
- Spritzen
 - o Injekt® 40 Solo (Insulinspritzen) von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
 - o Injekt® 2ml von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
 - o Injektomat®-Spritze 50 ml mit Kanüle von Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
- Spritzenabwurf Multi-Safe® von Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
- Spritzenpumpenleitung Clinico®, 150 cm, L-L von Clinico Medical GmbH, Bad Hersfeld, Deutschland
- Venenverweilkatheter Vasofix® Safety, 24G x ¾“ von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Wäscheklammer (als „Stauschlauch“ zum Legen des Venenverweilkatheters in die V. coccygea lateralis)
- Wattestäbchen von Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland

1.5 Geräte

1.5.1 Labor

- Blutgasanalysegerät ABL 510 von Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Dänemark
- Centrifuge 5430R eppendorf von Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Digital-Fieber-Thermometer „aniEXPRESS“ von Schreiber GmbH, Kreuzwertheim, Deutschland
- Dremel® 300 mit Diamantbohrkopf von Dremel Deutschland, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland
- Automatischer Leiselaufkompressor Sil-Air® 15A S230/50 von Werther International S.p.A., Cadé, Reggio Emilia, Italien

- Duran® Exsikkator von Duran Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
- Exacon® Temperatursonde Typ D-RA4 von Siemens Sector Healthcare (Teil der Siemens AG), Erlangen, Deutschland
- Guillotine, groß von Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
- Haake C10-B3 Thermostatbad mit Umwälzthermostat zur Beheizung der Operationsplatte von PSL Systemtechnik GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
- Handlötgerät Piezo-Compact PC 140 mit Universalgas (30% Propan/70% Butan) von CFH Löt- und Gasgeräte GmbH, Offenau, Deutschland
- Hochgeschwindigkeitskamera Basler A602f-2 (auf Mikroskop von Bresser angebracht) von Basler AG, Ahrensburg, Deutschland
- Inkubator Innova™ 4200 von New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, Vereinigte Staaten
- KLS Martin Minicutter Hochfrequenz Chirurgiegerät von Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
- Kühlschrank, 4°C von Bauknecht GmbH, Stuttgart, Deutschland
- Laufrad (Eigenbau des Institutes)
- LötKolben
- Mac Book Pro, Mac OS x, Version 10.5.1 von Apple Inc., Cupertino, Kalifornien, Vereinigte Staaten
- Magnetrührer RCT basic von IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
- Mikroskop von Bresser GmbH, jetzt Meade Instruments Europe GmbH & Co. KG, Rhede, Deutschland
- Operationsplatte (wasserbeheizt) mit Narkosemaske für Ratten (Eigenbau des Institutes)
- OPMI® pico (Operationsmikroskop) mit Stativfuß S100 von Carl Zeiss Meditec Vertriebsgesellschaft mbH, Oberkochen, Deutschland
- Oszillator Voltcraft® 7202 Sweep/ Function Generator (Funktionsgenerator) von Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland
- OxyFlo 2000®: Microvascular Perfusion Monitor von Oxford Optronix Ltd, Oxford, England
- OxyFlo XP Probe von Oxford Optronix Ltd, Oxford, England
- Präzisionsdruckregulator Manostat®R27 Watson Smith von Norgren Ltd, Leeds, England
- Präzisionsmikrometer, 0,01 mm, 0-25 mm
- Remington Body Hair Trimmer, Model BHT2000 Bodyguard von Remington Deutschland, Ellwangen, Deutschland

- Servomed (Monitor für Blutdruckmessung) von PPG Hellige GmbH, Freiburg im Breisgau, Deutschland
- Sigma Elite Vaporizer (Isofluranverdampfer) von Penlon Ltd, Abingdon, England
- Spritzenpumpe Becton Dickinson, Modell Program 1 von MC Medizintechnik GmbH, Alzenau-Hörstein, Deutschland
- Stereotaxierahmen „Elliptic Lab Standard™ Stereotaxic Instrument“ mit Non-Rupture Ear Bars von Stoelting Co., Wood Dale, Illinois, Vereinigte Staaten
- Waagen:
 - o Soehnle, Typ: Flip von Leifheit AG, Nassau, Deutschland
 - o Feinwaage: Kern ALJ 160-4 NM von Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
 - o Mettler PE 3600 Delta Range® von Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

1.5.2 Operationsinstrumente

- KLS Martin Bipolare Pinzette von Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
- Mikropinzetten:
 - o Aesculap BD 321 R und BD 329R von Aesculap Division B. Braun, Tuttlingen, Deutschland
 - o Fehling CAY-6 von Fehling Instruments, Karlstein, Deutschland
- Mikroschere Aesculap FM484R von Aesculap Division B. Braun, Tuttlingen, Deutschland
- Nadelhalter nach Mayo-Hegar, Aesculap DUROGRIP® BM065R von Aesculap Division B. Braun, Tuttlingen, Deutschland
- Pinzetten:
 - o Aesculap DUROGRIP® BD151 von Aesculap Division B. Braun, Tuttlingen, Deutschland
 - o chirurgisch, Standard, 11 cm von Berger Surgical Medical Products GmbH, Tuttlingen, Deutschland
- Retraktoren (Eigenbau)
- Scheren von Aesculap Division B. Braun, Tuttlingen, Deutschland:
 - o Aesculap DUROTIP® BC224R (spitz/stumpf)
 - o Aesculap DUROTIP® BC288R (spitz/spitz)
- Skalpellklingenhalter für Klinge Nr. 15 von Chr. Diener GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

1.5.3 *Ultraschall*

- Haltevorrichtung für die Ultraschallsonde (Eigenbau)
- Sonos® 7500 von Philips Ultrasound, Andover, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- 3 MHz transkranielle Farbduplexsonde (S3) von Philips Ultrasound, Andover, Massachusetts, Vereinigte Staaten

1.5.4 *Magnetresonanztomografie*

- Bruker PharmaScan 70/16 (7.0 T, 160 cm) von Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland
- linearpolarisierender Volumenresonator von Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland
- Halterung für Ratten aus Kunststoff mit Narkosemaske (Eigenbau des Institutes)
- Software Paravision 5.2 von Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland
- Software ImageJ 1.46 von National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Vereinigte Staaten

1.5.5 *Faden-/Thrombenherstellung, Gewebeuntersuchung/-aufbereitung*

- Arterienklemmen
- Clinitubes® 100 µl (heparinisierte Kapillare zur Blutgasanalyse) von Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Dänemark
- Combi-Stopper-Verschlussknoten, rot von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Ethicon® 4-0 Ethilon®II blau, Polyamid (H7143H) von Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
- Falcon® Tube 50 ml von Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland
- Glaskapillare ringcaps® 50 + 100 µl von Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
- Handschuhe Vasco® Sensitive, Größe M von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Infusionsschlauch Intrafix® Primeline Classic von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Kanülen:
 - o Sterican® 20G x 1 ½“ (gelb) und Sterican® 26G x ½“ (braun) von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
 - o Blunt Needle 26G x ½“ von Strategic Applications Inc., Lake Villa, Illinois, Vereinigte Staaten

- Katheter:
 - o Intramedic® PE-50-Katheter, i.d. 0,53 mm, o.d. 0,965 mm und Intramedic® PE-10-Katheter, i.d. 0,28 mm, o.d. 0,61 mm von Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
 - o SAI PE-8-Katheter, i.d. 0,20 mm, o.d. 0,36 mm von Strategic Applications Inc., Lake Villa, Illinois, Vereinigte Staaten
 - o PTFE-Chemieschlauch, natur (Teflonkatheter), i.d. 0,5 mm, o.d. 0,78 mm von Reichelt Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland
- Labortimer von Abcam plc, Cambridge, England
- Mikropinzetten
 - o Aesculap BD 321 R und BD 329R von Aesculap Division B. Braun, Tuttlingen, Deutschland
 - o Fehling CAY-6 von Fehling Instruments, Karlstein, Deutschland
- Mikroschere SCANLAN® Super Cut™ 7007-250SC von Scanlan International, Inc., Saint Paul, Minnesota, Vereinigte Staaten
- Mini-Spike® von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Nadelhalter nach Mathieu von Chr. Diener GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
- Papier von Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland
- Petrischale Falcon® von Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Pipetten:
 - o ACURA 825, 10 – 100 µl von Socorex ISBA SA, Ecublens/Lausanne, Schweiz
 - o SL-Pette, 100 – 1000 µl von Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, Deutschland
- Pipettenspitzen:
 - o Universalpipettenspitzen, 100 – 1000 µl von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
 - o SafeSeal-Tips® professional, 100 µl von Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Österreich
- Pinzetten:
 - o Aesculap DUROGRIP® BD151 von Aesculap Division B. Braun, Tuttlingen, Deutschland
 - o chirurgisch, Standard, 11 cm von Berger Surgical Medical Products GmbH, Tuttlingen, Deutschland
- Reaktionsgefäße, 2ml von Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Österreich
- Rotilabo®-Reaktionsgefäße, 1,5 ml von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Rotilabo®-Schraubdeckeldosen, unsteril, 20 ml von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

- Safety-Multifly®-Set, 23G, 200 mm lang von Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
- Scheren von Aesculap Division B. Braun, Tuttlingen, Deutschland:
 - o Aesculap DUROTIP® BC224R (spitz/stumpf)
 - o Aesculap DUROTIP® BC288R (spitz/spitz)
- Skalpellklingen Nr. 15, Sterile Surgical Blades von Aesculap Division B. Braun, Tuttlingen, Deutschland
- Skalpellklingenthalter für Klinge Nr. 15 von Chr. Diener GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
- Spatel, Edelstahl
- Spritzen von B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
 - o Injekt® 40 Solo (Insulinspritzen)
 - o Injekt® 2 ml, 5 ml, 10 ml
- Spritzenabwurf Multi-Safe® von Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland

1.5.6 Mikro-CT

- SkyScan® 1072, 80 kV von Skyscan, Kontich, Belgien
- Software:
 - o Analyze™ 9.0 von Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, Vereinigte Staaten
 - o Skyscanner Dataviewer, Skyscan, Kontich, Belgien

1.5.7 Statistik und Auswertung

- Notebook HP ProBook 4530s von Hewlett-Packard Development Company, L.P., Palo Alto, Kalifornien, Vereinigte Staaten
- Software Microsoft Office 2010 von Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten
- Software SPSS Statistics Version 16.0 für Microsoft Windows von IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland

5. Publikationen

5.1 In Zeitschriften

(1) Max Nedelmann, **Nadine Schleicher**, Simone Dönges, Peter Reuter, Manfred Kaps, Simon Urbanek, Niko Schwarz, Katharina Madlener, Markus Schönburg, Petr Urbanek, Tibo Gerriets:

“Ultrasound destruction of air microemboli as a novel approach to brain protection in cardiac surgery”

Accepted: Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia

Abstract

Objective: The authors evaluated a novel approach to eliminate air microemboli from extracorporeal circulation via ultrasonic destruction.

Design: In vitro proof of concept study.

Setting: Research laboratory.

Participants: None.

Interventions: None.

Measurements and Main Results: An extracorporeal circulation device was filled with human blood circulating at 3 l/min. Air bubbles were injected into the system. For bubble destruction, the blood line was repeatedly insonated for 3 min using a therapeutic 60 kHz device, with variation of intensity and duty cycle (DC) settings, ranging from 0.2 W/cm² to 1.0 W/cm² and from DC 60% to continuous wave (cw). Number and diameter of air microemboli were counted up- and downstream of the ultrasound device by two-channel microemboli Doppler detector. For safety assessment, circulating blood was continuously insonated for 2 h at 0.8 W/cm² cw and compared to circulation without insonation and standard blood parameters were analysed.

Without treatment, 1313 to 1580 emboli were detected upstream, diameter ranging between 10 and 130 µm. Ultrasound treatment eliminated up to 87% of all detected bubbles in cw application (p<0.01) and showed comparable effects at intensities from 0.4 W/cm² to 1.0 W/cm² cw. Bubbles sized >15 µm were almost completely eliminated (p<0.001). Pulsed application rendered inferior results (p>0.05). No relevant changes of blood parameters were observed compared to control circulation.

Conclusions: Ultrasound destruction of air emboli is a very efficient method to reduce number and size of emboli. Within the limits of safety assessment, we could not detect relevant side effects on standard blood parameters.

Key words: Brain; embolism; cardiopulmonary bypass; stroke; ultrasound

(2) Martin Jünemann*, Mesut Yenigün*, **Nadine Schleicher**, Johannes Blumenstein, Max Nedelmann, Marlene Tschernatsch, Georg Bachmann, Manfred Kaps, Petr Urbanek, Markus Schönburg, Tibo Gerriets:

*contributed equally

“Impact of bubble size in a rat model of cerebral air microembolization: does size matter?”

Submitted

Abstract

Aim: Cerebral air microembolization (CAM) is a frequent side effect of diagnostic or therapeutic interventions. Besides reduction of the amount of bubbles, filter systems may also lead to a dispersion of large gas bubbles and therefore to an increase of the potentially hazardous gas-endothelium interface. We aimed to evaluate the production and application of different defined bubble diameters in a rat model of CAM and assess embolization effects in relation to the bubble diameter.

Methods: Gas emboli of defined number and diameter were injected into the carotid artery of rats. Group I (n=7) received 1800 air bubbles with a diameter of 45µm, group II (n=7) 40 bubbles of 160µm, controls (n=6) saline without gas bubbles. Functional outcome was assessed at baseline, after 4h and 24h following cerebral MR imaging and infarct size calculation.

Results: Computer-aided evaluation of bubble diameters showed high constancy (group I: 45.83µm ± 2.79; group II: 159µm ± 1.26). Animals in group I and II suffered cerebral ischemia and clinical deterioration without any significant difference. Infarct sizes did not differ significantly between the two groups ($p=0.931$ u-test).

Conclusion: We can present feasibility of highly reliable controlled CAM with different bubble diameters, producing neurological deficits due to unilateral cerebral damage. Our findings may suggest that embolization effects depend on the total volume of applied air rather than on bubble size. This method will allow further investigations regarding the underlying pathology in the future.

Key words: animal experimentation; cerebral infarction; cardiopulmonary bypass; cardiac surgical procedures; gas embolism

(3) **Nadine Schleicher***, Amelia J. Tomkins*, Marian Kampschulte, Yan Feng, Jean-Marc Hyvelin, Martin Jünemann, Mesut Yenigün, Manfred Kaps, Neil J. Spratt, Tibo Gerriets, Max Nedelmann:

*contributed equally

“Efficacy of the novel therapeutic microbubble preparation BR38 in sonothrombolysis of acute cerebral small artery occlusion”

Currently working on, to be submitted

Abstract

Background and Purpose: Previous studies suggest an augmenting effect of microbubble contrast agents containing perfluor gases on sonothrombolysis, but were mainly focused on treatment of large artery occlusion. In this study, we tested a novel therapeutic microbubble preparation (BR38) and the diagnostic compound SonoVue™ in a rat model of small artery occlusion.

Methods: 36 male WU rats underwent laser Doppler controlled MCAO (90 minutes). After reperfusion the animals were randomized (n=6): (A) control, (B) rt-PA, (C) 3 MHz ultrasound (US) (TCCS, MI=1.7) + rt-PA + BR38 full dose ($4 \cdot 10^8$ microbubbles/ml), (D) US + rt-PA + BR38 1/3 dose, (E) US + rt-PA + SonoVue™ full dose (equal to BR38), (F) US + rt-PA + SonoVue™ 1/3 dose. After 60 minutes treatment rats were sacrificed, brains perfused with a radio-opaque substance and removed for microcomputed angiography. The vascular volume fraction (VVF) of regions of interest in the left and right MCA territory was determined.

Results: Microcomputed angiography revealed a significantly reduced VVF within the right MCA territory (expressed as % of left VVF) in groups A and B ($p < 0.05$). In comparison, microbubble augmented treatment improved VVF to a non-significant level in right-left comparison. Effects were comparably seen for BR38 and SonoVue™ treatment.

Conclusion: We found a positive treatment effect for BR38 augmented sonothrombolysis on small artery occlusion. Compared to SonoVue™, BR38 is characterized by a different gas compound, smaller diameter of microbubbles and higher stability in circulation. However, treatment effects seen for BR38 and SonoVue™ were comparable with chosen ultrasound setting.

Key words: stroke; sonothrombolysis; microbubbles; microcirculation; no reflow phenomenon

(4) Martin Jünemann*, Sinja Gögel*, Martin Obert, **Nadine Schleicher**, Nouha Ritschel, Simone Dönges, Inka Eitenmüller, Saskia Peters, Niko Schwarz, Sabrina Kastaun, Mesut Yenigün, Marlene Tschernatsch, Astrid Grams, Horst Traupe, Elke Gizewski, Tibo Gerriets:

*contributed equally

“Flat panel volumetric computed tomography in cerebral perfusion: evaluation of three rat stroke models”

Submitted

Abstract

Objectives: The present study was conducted to assess feasibility and validity of cerebral perfusion measurement with experimental flat panel volume CT (fpVCT) by evaluation of three common rat stroke models for middle cerebral artery occlusion (MCAO).

Methods: 32 male Wistar rats were subjected to temporary MCAO for 90 minutes (group I, n=10), permanent MCAO (group II, n=9) using the suture model in both groups, permanent MCAO using the macrosphere model (group III, n=9) and to a control group (group IV, n=4). Clinical testing was performed at baseline and 24h after MCAO. Perfusion investigation with experimental fpVCT took place 24 hours after MCAO following post mortem detection of infarct volume by TTC-staining.

Results: Clinical examination and measurement of infarct volumes revealed no significant differences throughout intervention groups. After permanent MCAO there was a significant decrease of cerebral blood flow (CBF) in subcortical regions to 78,2 % (group II, p=0.005) and 79,9 % (group III, p=0.012) and in total hemisphere to 77,4 % (group II, p=0.01) and 81,97 % (group III, p=0.049). CBF appeared to be less impaired with temporary vessel occlusion. Cerebral blood volume measurement revealed no significant differences.

Conclusion: Cerebral perfusion measurement in rats with the fpVCT is feasible and enables detection of hypoperfusion 24 h after MCAO as well as delineation of perfusion differences between different rat models of stroke. fpVCT can be a useful tool for non-invasive dynamic imaging of cerebral perfusion in rodent models for stroke and may help facilitating future studies on pathophysiology and therapy.

Key words: flat panel Volume CT; cerebral perfusion; animal model; stroke

5.2 Auf Kongressen

(1) **Nadine Schleicher**, Maureen Walberer, Mesut Yenigün, Georg Bachmann, Petr Urbanek, Markus Schönburg, Thomas Walther, Tibo Gerriets:

“An animal model of controlled cerebral air microembolism”

Poster Presentation: 7th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair 2012, May 2–5, 2012, Potsdam, Germany

Abstract

Objectives: Cerebral air microembolism (CAM) is largely caused by neurologic and cardiologic interventions. Subtle CAM considerably contributes to persistent neuropsychological deficits and the underlying pathophysiology is generally still unknown. Thus, we developed an appropriate animal model that enables the embolization of air bubbles of defined number and diameter.

Furthermore, filter systems to reduce the amount of named gaseous cerebral emboli are commonly used during surgery but only a few filter types actually reduce the total number of gas bubbles. Most of the filter systems only disperse large bubbles into numerous smaller particles, which increase the potentially dangerous gas-endothelium contact. Therefore, to determine the impact of air bubble size on neurological outcome after CAM we performed the present animal study.

Material and methods: For the creation of gaseous microemboli a custom-made device was developed. It consists of a small glass capillary which is positioned within a larger glass tube. Air at a precisely adjustable pressure was piped through the capillary while the outer tube was flooded with a constant flow of saline. To vary the bubble diameter the inner capillary was oscillated. A high speed optical image capturing system and a custom-made software were used to quantify the number and diameter of the gas bubbles.

17 male Wistar rats were randomized into 3 groups: Group I and II (n=6 per group) each received the identical total air volume of 86µl via the right carotid artery (group I 1800 air bubbles of 45µm, group II 40 bubbles of 160µm). Group III (n=5) received saline without gas bubbles. After 4h and 24h functional neurological outcome was assessed and 7T-MRI was carried out after 24h.

Results: In group I the actual bubble size was 45.8µm±2.8 and in group II 159.0µm±1.3. The effective bubble count amounted to 1808±11 in group I and 40±0.4 in group II.

The neurological score was 15±11.8 after 4h and 10±5.5 after 24h in group I and 19.2±11.1 after 4h and 19±10.2 after 24h in group II (no significant difference).

Mean infarct size was likewise comparable in both groups without any significant difference (group I: 10.0%±14.5; group II: 5.4.%±6.1; p=0.53).

In the sham infusion group no pathological findings were detectable.

Conclusion: The bubble generator produces air microemboli of defined number and size and therefore allows investigation of CAM under highly standardized conditions.

A preliminary study showed that bubbles of 160µm in diameter caused brain infarcts in a dose dependent manner (data not presented here).

However, this study showed that the actual size of the air bubbles doesn't affect size of the infarct or the functional neurological -outcome.

The neurological side effects of CAM depend only on the total volume of embolised air and not on the actual size of the air bubbles. These results may have further impact for clinical protection of cerebral air microembolisation.

(2) **Nadine Schleicher**, Amelia J. Tomkins, Marian Kampschulte, Yan Feng, Jean-Marc Hyvelin, Martin Jünemann, Mesut Yenigün, Manfred Kaps, Neil J. Spratt, Tibo Gerriets, Max Nedelmann:

“Efficacy of the novel therapeutic microbubble preparation BR38 in sonothrombolysis (ST) of acute cerebral small artery occlusion”

Oral Presentation: 22. European Stroke Conference, May 28–31, 2013, London, United Kingdom

Abstract

Background: Clinical and experimental data suggest augmenting effects of microbubble contrast agents containing perfluor gases on ST. Previous studies focused on large artery occlusion (MCAO) and on therapeutic use of diagnostic contrast agents. In this study, we tested a novel therapeutic C4F10/N2 containing microbubble preparation (BR38, Bracco Research, Geneva) in a rat model of small artery occlusion and compared its effects with SF6 containing contrast agent BR1 (SonoVue™). The animal model is based on previous studies showing persisting microvascular thrombotic obstruction after reperfusion of 90min MCAO.

Methods: 36 male WU rats underwent laser Doppler controlled MCA filament occlusion. After 90min reperfusion was induced and rats were randomized into experimental groups with following treatment allocation (n=6): (A) control, (B) tPA, (C) 3 MHz ultrasound (TCCS, MI=1.7) (US) + tPA + BR38 full dose ($4 \cdot 10^8$ microbubbles/ml), (D) US + tPA + BR38 1/3 dose, (E) US + tPA + BR1 full dose ($4 \cdot 10^8$ microbubbles/ml), (F) US + tPA + BR1 1/3 dose. After 60min treatment rats were sacrificed, brains perfused with radio-opaque substance Microfil™ and removed for micro CT angiography. The vascular volume fraction (VVF) of regions of interest in the left and right MCA territory was determined.

Results: Micro CT revealed a significantly reduced VVF within the right MCA territory (expressed as % of left VVF) in groups A and B. In comparison, microbubble augmented treatment improved VVF to a non-significant level in right-left comparison (figure). Effects were comparable for BR38 and BR1 treatment. Hemorrhage was not found on macroscopic examination.

Conclusion: We found a positive treatment effect for BR38 augmented sonothrombolysis on small artery occlusion. Compared to BR1, BR38 is characterized by a different gas compound, smaller diameter of microbubbles and higher stability in circulation. However, treatment effects seen for BR38 and BR1 were comparable with chosen ultrasound setting.

(3) Amelia J. Tomkins, **Nadine Schleicher**, Max Nedelmann, Neil J. Spratt:

“Platelet rich clots are resistant to lysis by thrombolytic therapy in a rat model of embolic stroke”

Poster Presentation: 22. European Stroke Conference, May 28–31, 2013, London, United Kingdom

Abstract

Background: Early recanalization of occluded vessels in stroke is associated with improved outcome but recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) treatment benefits less than half of patients treated. New methods are emerging to enhance the thrombolytic effect of rtPA e.g. microbubble-enhanced sonothrombolysis (ultrasound). Models of embolic stroke are most appropriate for preclinical thrombolytic testing due to the presence of thrombi, yet a standard model is lacking due to high variability of outcomes. We aimed to design an embolic model with stable occlusion of the middle cerebral artery (MCA) and to test the efficacy of microbubble-enhanced sonothrombolysis.

Methods: Spontaneously hypertensive rats (SHR) underwent MCA embolism with site-specific delivery to the MCA origin of preformed platelet-rich clots (PRC). A preliminary study (n = 7) used continuous laser Doppler (LD) monitoring for 4 h post-embolism and sacrifice at 24 h to investigate spontaneous recanalization rates and infarct volumes. Effect of thrombolysis was then studied in 3 groups: rtPA (10 mg/kg), rtPA + ultrasound + BR38 microbubbles and saline control (n = 10 per group). Treatment onset was 60 min post-embolism and lasting 60 min. Intermittent LD recordings were made during the protocol. Sacrifice was post-treatment and brains were perfused to determine presence and location of remaining clots.

Results: MCAo with PRC resulted in large infarcts in all cases ($47.26 \pm 7.97\%$ of ipsilateral hemisphere). In the preliminary study, LD reperfusion occurred in 2/7 animals (40.08 and 69.83 min post-embolism) and there was 1 mortality due to large infarction. In the treatment study, no reperfusion was observed by LD monitoring, and clot was identified in the major cerebral vasculature at post mortem in all animals.

Conclusions: Site-specific delivery of PRC produce large infarction in the SHR however clots are highly stable and resistant to both spontaneous lysis and thrombolytic treatment making this model unsuitable to study new thrombolytics.

6. Danksagung

Die Fertigstellung meiner Doktorarbeit wäre ohne die Hilfe folgender Personen und Institutionen nicht möglich gewesen. Daher danke ich recht herzlich

- Herrn Prof. Dr. Max Nedelmann für das Überlassen des Themas, für die wunderbar unkomplizierte und herzliche Betreuung, die unzähligen konstruktiven Diskussionen, wertvollen Gespräche und Anregungen sowie den Ansporn in den letzten zweieinhalb Jahren.
- Frau Prof. Dr. Sabine Wenisch für die spontane Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität Gießen zu betreuen und für die freundliche Zusammenarbeit.
- Herrn Prof. Dr. Tibo Gerriets für die herzliche Betreuung sowie für die vielen ausgiebigen Diskussionen, Ideen und Anregungen der letzten zweieinhalb Jahre.
- Herrn Prof. Dr. Manfred Kaps, der mit diese Doktorarbeit seitens des Universitätsklinikums Gießen ermöglicht hat und Herrn Prof. Dr. Georg Bachmann für die Ermöglichung der Durchführung von Seiten der Kerckhoff-Klinik.
- Der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim und dem Universitätsklinikum Gießen für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Anfertigung dieser Promotionsarbeit und dem Max Planck Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim für die Unterbringung und Betreuung der Versuchstiere.
- Herrn Prof. Dr. Markus Schönburg und Herrn Dr. Petr Urbanek für die Zusammenarbeit und Hilfestellung das Gasbläschenmodell betreffend.
- Herrn Dr. Clemens Müller, Frau Dr. Astrid Wietelmann und Frau Ursula Hofmann für die allzeitige Bereitschaft, bei Fragen und Problemen das MRT betreffend weiterzuhelfen.
- Jean-Marc Hyvelin und Feng Yan von der Firma Bracco Research S.A. für die kooperative Zusammenarbeit bezüglich BR1 und BR38.

- Meinen vielen weiteren Kollegen im Franz-Grödel-Institut der Kerckhoff-Klinik für die tolle Arbeitsatmosphäre, insbesondere
 - Dr. Peter Reuter für die Spitzen-Einarbeitung!
 - Simone Dönges für die allzeitige Hilfsbereitschaft und das gründliche Einlernen.
 - Amelia Tomkins für die gemeinsame Arbeit und die tolle Unterstützung beim Thrombemboliemodell und den Mikro-CT-Untersuchungen!
 - Dr. Martin Jünemann, Dr. Niko Schwarz, Sabrina Kastaun und Mesut Yenigün für die unzähligen motivierenden und konstruktiven Gespräche, Ideen und Anregungen.
 - den Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe „Experimentelle Kardiologie“ für das gesellige Beisammensein der zurückliegenden zweieinhalb Jahre und die Möglichkeit, die Laborräume und viele der Gerätschaften mit zu nutzen.

- Meinen guten Freunden, Korrekturlesern und Motivatoren für die Unterstützung, die Zerstreuungen und Mußestunden.

- Meinen Eltern. Danke. Für alles!!

7. Erklärung

Erklärung gemäß § 10, Absatz 6 der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen in der aktuellen Fassung vom 11.07.2012:

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6028-2



9 783835 196028 2