

LAURA SÜNNER

Experimentelle Sonothrombolyse im Thrombemboliemodell an der Ratte



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.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

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

1. Auflage 2022

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 Authors or the Publisher.

1st Edition 2022

© 2022 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut der Veterinär-Physiologie und -Biochemie
der Justus-Liebig Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

und

Der Neurologischen Klinik
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Tibo Gerriets

Experimentelle Sonothrombolyse im Thrombembolienmodell an der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Laura Süner

Tierärztin aus Mainz

Gießen 2022

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter: Prof. Dr. J. Roth

Prof. Dr. T. Gerriets

Prof. Dr. M. Schmidt

Tag der Disputation: 27.05.2022

Für meine Familie

Einleitung.....	7
Der Schlaganfall	7
Ursachen	8
Diagnostik.....	11
Therapie	12
Ratten in der Schlaganfallforschung.....	15
Vergleich der anatomischen Strukturen – Ratte versus Mensch	15
Die Schlaganfallmodelle.....	16
Ultraschallbehandlung beim Schlaganfall (Sonothrombolyse).....	18
Allgemein.....	18
Experimentelle Untersuchungen.....	20
Diagnostischer Ultraschall – die Wahl der Parameter	22
Bracco 38 - Microbubbles in der Schlaganfalltherapie in Kombination mit Ultraschall.....	24
Rt-PA, Ultraschall und Microbubbles als Kombinationstherapie	26
Zielsetzung und Fragestellung	27
Material und Methoden.....	28
Tierversuchsantrag	28
Versuchstiere	28
Anästhesie und Überwachung während der Narkose.....	28
Herstellung eines autologen Vollblut-Thrombus	29
Schmerzmanagement	30
Thrombembolienmodell.....	30
Randomisierung und Verblindung.....	33
Ein- und Ausschlusskriterien	34
Neuroscore-Test.....	34
Rotarod-Test.....	35
Durchführung der Magnetresonanztomographie Messungen.....	36
MRT-Technik	37
Grundlagen.....	37
Position und Lage der Ratte im MRT	38
Wichtige MRT Sequenzen.....	38
Auswertung.....	39
Unkorrigiertes Volumenverhältnis	40
Töten der Tiere und Entnahme des Gehirns	40
Herstellung und Beurteilung der histologischen Präparate.....	40

Statistik.....	41
Ergebnisse:.....	42
Klinische Befunde.....	42
Infarktgrößen	44
Darstellung der Ergebnisse der T2Q-Messung	44
Unkorrigiertes Volumenverhältnis der Infarkte in der T2Q- Messung	48
Intrazerebrale Blutungen	51
Ergebnisse der MRT-Messung	51
Ergebnisse der histologischen Untersuchung	53
Diskussion:.....	54
Neuroscore und Rotarod-Test.....	54
Hypothesen.....	54
1. Die Größe der Schlaganfälle nach der zweiten MRT - Messung ist in der Kombinationsgruppe mit der Therapie rt-PA, Ultraschall und BR38 am kleinsten.....	54
2. Zunahme der Infarktgröße ist in der Kombinationsgruppe von erster MRT-Messung zu zweiter MRT-Messung am kleinsten.....	55
3. Die Anwendung der Sonothrombolyse ist sicher.....	59
Limitationen.....	60
Ausblick.....	61
Zusammenfassung:	63
Summary:	64
Literaturverzeichnis:	65
Anhang:.....	74
Abkürzungsverzeichnis.....	74
Abbildungsverzeichnis	75
Tabellenverzeichnis.....	77
Materialliste	77
Laborgeräte	77
Verbrauchsmaterial.....	78
Medikamente	79
MRT.....	79
Vorträge	80

Eigene Publikationen	80
Danksagungen	81
Erklärung.....	82
Lebenslauf.....	83

Einleitung

Der Schlaganfall

Der Schlaganfall ist mittlerweile die zweithäufigste Todesursache weltweit und die Hauptursache für bleibende Behinderungen bei Erwachsenen (Lee, Yeh et al. 2017, Auboire, Sennoga et al. 2018). Die häufigste Ursache für einen Schlaganfall ist, mit bis zu 85 Prozent, ein akuter Verschluss der hirnversorgenden Arterien (ischämischer Hirninfarkt) durch arterio-arterielle oder kardiale Embolien. In 10-15 Prozent wird der Schlaganfall durch eine intrazerebrale Blutung ausgelöst (Ma, Li et al. 2016).

Der ischämische Schlaganfall ist definiert durch einen partiellen oder kompletten Verschluss der Blutzufuhr zu Teilen des Gehirngewebes, wodurch es zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen kommt (Chen, Xue et al. 2019). Die Unterbrechung der Blutzufuhr kann durch lokale Thrombose oder eine Embolie entstehen. Jede Ursache ist assoziiert mit unterschiedlichen Infarkt-Mechanismen und Größen, die von lakulären Infarkten der kleinen Arterien bis hin zu großen Territorialinfarkten reichen (Carmichael 2005). Bei schweren Schlaganfällen sind oft die großen, proximalen Arterien betroffen (Barlinn, Tsivgoulis et al. 2014). Das am häufigsten betroffene Gefäß ist die Arteria cerebri media (Howells, Porritt et al. 2010). Sie versorgt den größten Teil einer Großhirnhemisphäre (Lee 1995) und ist für ungefähr 70% aller Schlaganfälle verantwortlich (Fluri, Schuhmann et al. 2015). Von einem malignen Infarkt spricht man, wenn das ischämische Gebiet anschwillt und Raum einfordernd im Schädel wirkt (siehe Abbildung 1), meistens ist dabei mehr als 39% der ipsilateralen Hemisphäre betroffen (Carmichael 2005).

Symptome eines Schlaganfalls können beispielsweise plötzlich aufgetretene Halbseitenlähmungen, Sensibilitäts-, Sprach- oder Sprechstörungen, Doppelbilder oder Sehstörungen sein (Yew and Cheng 2015).

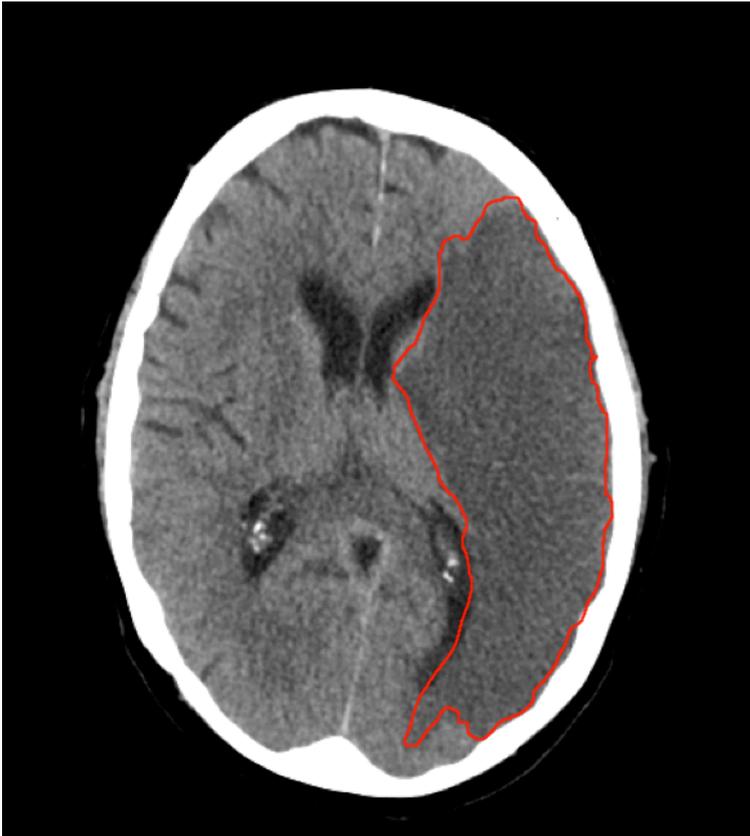


Abb. 1: Abbildung einer nativen CT-Untersuchung- von einem Gehirn eines Menschen mit ischämischem Schlaganfall (rot eingekreist). Es handelt sich um einen nahezu kompletten Infarkt der A. cerebri media.

Ursachen

Die Ursachen werden klassischerweise nach den TOAST- Kriterien (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment) eingeteilt (Adams, Bendixen et al. 1993).

Ursachen eines akuten ischämischen Schlaganfalls nach den TOAST-Kriterien:

- Makroangiopathie (Arteriosklerose, Thrombose oder Stenose eines Gefäßes um mehr als 50%)
- Kardiale Embolie (Vorhofflimmern, Persistierendes Foramen Ovale, kardialer Thrombus)
- Mikroangiopathie (Arteriosklerose, Lipohyalinose)
- Andere Ursache (z.B. Vaskulitis, Dissektion, Gerinnungsstörungen)
- Unklare Ätiologie (mehrere Ursachen nachgewiesen oder keine geklärte Pathogenese)

Sind ein oder mehrere Gefäße verschlossen, kommt es im Versorgungsgebiet des Gefäßes zu einem Mangel an Sauerstoff und Energieträgern. Die ersten Anzeichen für die nachfolgende Pathophysiologie liefert das Hirnödem. Es ist einer der wichtigsten Faktoren, die darüber entscheiden, ob der Patient die erste Stunden nach dem Schlaganfall überlebt (Dirnagl, Iadecola et al. 1999). Die Folge eines Hirnödems ist die Bildung von reaktiven

Sauerstoffspezies, Freisetzung von Glutamat, Akkumulation von intrazellulärem Kalzium und die Induktion von Entzündungsprozessen. Dieser Ablauf von Prozessen wird ischämische Kaskade genannt und führt zu einer irreversiblen Schädigung des Hirngewebes (Infarkt). Zu den wichtigsten Mechanismen dieser Kaskade gehören Exzitotoxizität, Depolarisation in der Nähe des Infarkts, Entzündung und programmierter Zelltod (Dirnagl, Iadecola et al. 1999). Die ischämische Penumbra, das Gewebe, das in direkter Nachbarschaft des Infarktgewebes liegt, ist prinzipiell in der Lage sich zu regenerieren, wenn der Blutfluss wiederhergestellt wurde, (Fluri, Schuhmann et al. 2015). Dieses Gebiet des Gehirns ist zwar in seiner Funktion gestört, aber nicht im Strukturstoffwechsel. In der Penumbra sind inaktive Zellen vorhanden, die mehrere Stunden bei ausreichendem regionalem CBF (zerebralen Blutfluss) überleben können. Bei der Regeneration dieses Gewebes sind zwei Komponenten entscheidend: Die Zeit und der verbliebene kollaterale Blutfluss. Je schneller eine Behandlung stattfindet oder je mehr kollateraler Blutfluss vorhanden ist, desto besser und schneller ist die Regeneration der Penumbra (Lyden 2019).

Im Falle eines Verschlusses eines Gefäßes kann eine Versorgung über präformierte Kollateralkreisläufe erfolgen. Die bedeutsamste Kollateralverbindung besteht mit dem Circulus arteriosus Wilisii (siehe Abbildung 2) über die A. communicans anterior und die beiden Aa. communicantes posteriores. Daneben existieren auch leptomeningeale Anastomosen oder Verbindungen im Karotisstromgebiet (Lee 1995).

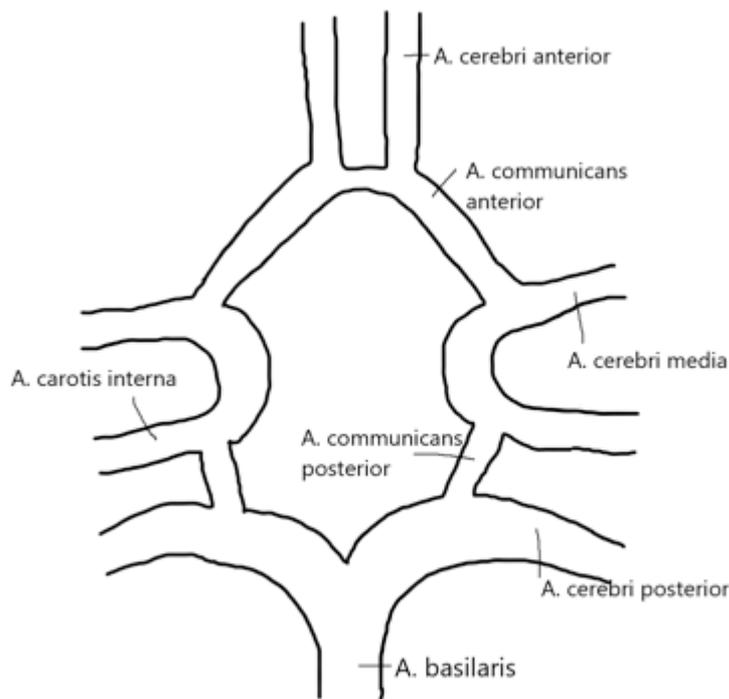


Abb.2: Circulus arteriosus Willisii beim Menschen.

Eine der häufigsten Ursachen für einen ischämischen Schlaganfall ist die Entstehung von Embolien (Daffertshofer, Huang et al. 2004, Ma, Li et al. 2016). Embolische Schlaganfälle entstehen, wenn Material abgeschwemmt wird und in Richtung Gehirn gespült wird und so einen Verschluss bedingt. Im Gegensatz dazu steht die Thrombose, bei der die Blutgerinnsel direkt am Ort des Verschlusses entstehen. Teilweise werden auch Mikrothromben vom eigentlich Hauptthrombus weiter abgeschwemmt und führen in kleineren Gefäßen zu einem Verschluss (Lu, Wang et al. 2016, Schleicher, Tomkins et al. 2016).

Ein Embolus kann vom Herzen (z.B. Vorhofthrombus, Endokarditiden), von den proximalen Arterien (Aortenbogen, Karotiden) oder aus dem venösen System (paradoxe Embolie, bspw. aus den Beinvenen bei einem offenen Foramen Ovale) stammen (Hart, Diener et al. 2014). Die Emboli können aus unterschiedlichem Material aufgebaut sein. Mögliche Zusammensetzungen können aus Thrombusgewebe, Tumorzellen, Kalzifikationsfragmenten oder infektiösem Gewebe bestehen (Hart, Diener et al. 2014).

Thrombotische Schlaganfälle entstehen in-situ im Bereich der hirnversorgenden Gefäße (Dixon, Li et al. 2019). Von einer Stenose wird gesprochen, wenn sich der Durchmesser durch Ablagerungen oder krankhaften Veränderungen wie Arteriosklerose verschmälert

(Randolph 2016). Das trifft bei etwa 15% der an einem Schlaganfall erkrankten älteren Gesellschaft zu.

Einige andere Erkrankungen oder auch Drogenkonsum (bspw. Kokain) können ein Risiko zur Erkrankung an einem Schlaganfall sein. So ist in einer Studie von Howells et. al. aus dem Jahre 2010 untersucht worden, wie Bluthochdruck, Diabetes, Adipositas und extensives Rauchen das Risiko erhöhen (Howells, Porritt et al. 2010).

Diagnostik

Die Diagnose eines Schlaganfalles wird klinisch nach Anamnese und körperlicher Untersuchung gestellt. Wichtigstes Merkmal bei der Anamnese und klinischen Untersuchung ist hierbei das plötzliche Auftreten von fokal-neurologischen Defiziten. Zur Dokumentation des Schweregrades des Schlaganfalls wird in der Regel die National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) herangezogen (Yew and Cheng 2015). Bei der klinischen Untersuchung kann nicht zwischen einem Infarkt oder einer Hirnblutung unterschieden werden, daher ist die Durchführung einer anschließenden Bildgebung zwingend erforderlich. Die Ursache einer Ischämie lässt sich allerdings damit nicht sicher bestimmen. Aus dem Muster des Infarktes können aber teilweise Ursachen vermutet werden. Zur Ursachenabklärung sind weitere Untersuchungen notwendig.

Nach der Einlieferung des Patienten in die „Stroke Unit“ oder eine Notaufnahme erfolgt umgehend eine neurologische Untersuchung, eine Blutentnahme und die Vitalparameter werden bestimmt (Jung, Stapf et al. 2015). Bestätigt sich der Verdacht auf einen Schlaganfall, erfolgt sofort eine bildgebende Darstellung des Gehirns mittels CT(Computertomographie) oder MRT(Magnetresonanztomographie). Die MRT eignet sich sehr gut zur Darstellung eines akuten, ischämischen Schlaganfalls, da ischämische Veränderungen hier frühzeitiger nachweisbar sind als in der CT. Allerdings ist die CT schneller sowie häufiger verfügbar und daher die primäre Bildgebung um eine Entscheidung für oder gegen eine Therapie zu treffen. Auch eignet sich die CT für Patienten mit Implantaten, wie zum Beispiel ein Herzschrittmacher (Yew and Cheng 2015). Daher wird in den meisten Fällen eine sofortige CT durchgeführt. Unmittelbar im Anschluss kann zusätzlich noch eine CT-Angiographie und eine CT-Perfusion durchgeführt werden. CT-Angiographie und CT-Perfusion ermöglichen eine Identifizierung des Infarktgebietes, eines Gefäßverschlusses oder einer Stenose. Mit diesen Informationen kann gegebenenfalls eine rekanalisierende Therapie eingeleitet werden (Allmendinger, Tang et al. 2012).

Eine Rekanalisationsbehandlung kann entweder durch eine intravenöse systemische Thrombolyse oder eine Thrombektomie erfolgen (s.u.). Danach wird der Patient auf die Stroke Unit verlegt. Hier erfolgt die weitere Abklärung der Infarkursachen und die Einleitung einer sekundärprophylaktischen Therapie.

Für die Bestimmung der Ursachen erfolgen auf der Stroke Unit die Abklärung mittels Echokardiographie (EKG), Langzeit-Elektrokardiographie, Ultraschall der hirnersorgenden Arterien oder eine transthorakale (TTE) oder eine transösophageale Echokardiographie (TEE) (Fan, Yu et al.). Das Langzeit-EKG dient der Diagnose eines möglichen Vorhofflimmerns. Stenosen der hirnersorgenden Arterien sind mittels Ultraschalls nachweisbar. Eine TTE oder TEE werden zum Nachweis struktureller kardialer Veränderungen durchgeführt (Ringleb P., Köhrmann M., Jansen O., et al.: Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls, S2e-Leitlinie, 2021, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 24.11.2021)). Wenn nötig kann im Anschluss eine Rehabilitationsmaßnahme eingeleitet werden.

Therapie

Der Therapieerfolg in der Akutphase hängt von einer schnellen Rekanalisation des verschlossenen Hirngefäßes ab („time-is-brain“-Konzept). Das Ziel der Therapie ist die schnelle Wiederherstellung der Durchblutung der Penumbra und damit die Begrenzung der Ausmaße des Infarktkerns. Eine spontane Rekanalisation ist nur bei circa 20% aller Patienten zu beobachten (Mori, Yoneda et al. 1992).

Eine Option zur Rekanalisation des Gefäßes ist die systemische intravenöse Gabe von rekombinant hergestelltem Gewebe- Plasminogenaktivator (rt-PA - recombinant tissue-type plasminogen activator) (National Institute of Neurological and Stroke rt 1995, Hacke, Kaste et al. 2008). Diese Therapie kann innerhalb der ersten 4,5 Stunden nach Symptombeginn nach Ausschluss von Kontraindikationen erfolgen (Hacke, Kaste et al. 2008). Die Wirksamkeit und Sicherheit gilt als erwiesen (Hacke, Kaste et al. 2008, Wahlgren, Ahmed et al. 2008). Außerhalb des Zeitfensters von 4,5 Stunden steigt das Risiko von Blutungskomplikationen.

Als Kontraindikationen gelten ein Alter über 80 Jahre, Antikoagulantien-Therapie, ein zurückliegender Hirninfarkt, eine erhöhte Blutungsneigung oder eine Hirnblutung (Fachinformation Actilyse, Boehringer Ingelheim, 2019).

Außerhalb der Zulassungskriterien steigt die Rate an intrazerebralen Blutungskomplikationen. Jedoch treten die formalen Kontraindikationen im klinischen Alltag zunehmend in den Hintergrund, weil sich dennoch eine überlegene Wirksamkeit in bestimmten Patientenkollektiven gezeigt hat. So profitieren beispielsweise auch Patienten, die älter als 80 Jahr sind, von einer systemischen Thrombolyse (Sandercock, Lindley et al. 2008). Auch kann durch elaborierte Bildgebung wie beispielsweise Computertomographie mit Perfusionsmessungen oder eine MRT mit Diffusionssequenzen eine Patientenselektion erfolgen, wenn sich potenziell rettbares Gewebe in diesen Untersuchungen zeigt (Albers, Marks et al. 2018, Nogueira, Jadhav et al. 2018, Thomalla, Simonsen et al. 2018).

Bei Verschlüssen der proximalen Arterien (A. carotis interna oder A. cerebri media) ist die Wirksamkeit von rt-PA oft nicht ausreichend (Reinhard, Taschner et al. 2015, Bracad, Ducrocq et al. 2016).

In den letzten Jahren war es möglich die Wirksamkeit der interventionellen Wiedereröffnung eines okkludierten Gefäßes in Kombination mit rt-PA oder ohne rt-PA nachzuweisen. Durch die Veröffentlichungen der Ergebnisse der wegführenden Studien zur Thrombektomie (MR-CLEAN28, ESCAPE29, EXTEND-IA30, SWIFT-PRIME31, REVASCAT32) im Jahre 2016 und einer Metaanalyse dieser Studien (Goyal, Menon et al. 2016) findet die Therapie in spezialisierten Zentren eine weite Anwendung. Diese Therapiemöglichkeit ist auch außerhalb des 4,5-Stunden-Zeitfensters anwendbar, wenn spezielle Bildgebung zur Darstellung von potenziell rettbarem Hirngewebe und damit zur Patientenselektion zur Verfügung steht. Dies kann mittels Perfusions-Bildgebung in der CT oder in der MRT erfolgen. Hierbei wird ein Unterschied („mismatch“) zwischen CBF und zerebralem regionalem Blutvolumen (CBV) potenziell rettbares Gewebe dargestellt (CBV/CBF-mismatch). Auch ist es möglich durch die Darstellung des Gehirnes im MRT noch nicht irreversibel geschädigtes Gewebe nachzuweisen, da sich in diffusionsgewichteten Sequenzen eine Ischämie kurz nach Symptombeginn zeigt, in FLAIR-gewichteten Sequenzen (fluid attenuated inversion recovery) jedoch erst nach 4-6 Stunden (DWI-FLAIR-mismatch). Ebenso ist von möglich rettbarem Gewebe bei weitgehend unauffälliger CT-Bildgebung und schwerem Krankheitsverlauf auszugehen (klinisch-bildgebendes mismatch). Unter Berücksichtigung

des Blutungsrisikos bei größeren bereits demarkierten Infarkten kann auch gegebenenfalls eine systemische intravenöse Thrombolyse ergänzt werden. In allen mismatch-Situationen konnte zuletzt eine Überlegenheit der Thrombolyse und Thrombektomie nachgewiesen werden (Barow and Thomalla 2019, Braun 2021).

Seit der Einführung der sogenannten „Stroke Units“ im Jahre 1990 werden Schlaganfallpatienten in Deutschland von einem strukturierten, interdisziplinärem Team auf diesen Stationen betreut (Lyden 2019). Dieses Team besteht aus Neurologen, Internisten, Neurochirurgen, Logopäden, Ergo- und Physiotherapeuten, Pflegepersonal und dem Rettungsdienst. Auf diese Weise ist es möglich die Diagnostik, die Akut-Therapie, die Ursachenabklärung und Sekundärprophylaxe sowie die Frührehabilitation an einem Ort durchzuführen. Der bedeutendste Wirkmechanismus ist wahrscheinlich die sorgfältige Einstellung der Vitalparameter, da Abweichungen von Körpertemperatur, Blutzucker und Blutdruck zu einem schlechteren Outcome führen (Langhorne and Pollock 2002, Sandercock, Counsell et al. 2008, Ahmed, Wahlgren et al. 2009, Sobesky 2009). Zusätzlich sollen Schlaganfallpatienten auf eine Dysphagie untersucht werden, da Aspirationspneumonien die häufigste Todesursache nach einem Schlaganfall sind (Sobesky 2009). Die Wahrscheinlichkeit, ein Jahr nach dem Schlaganfall noch am Leben und unabhängig zu sein und zu Hause zu leben, ist wesentlich höher nach einer Behandlung auf einer Stroke Unit im Vergleich zu einer Behandlung auf einer normalen Station. Die offensichtlichen Vorteile sind unabhängig von Alter, Geschlecht, Schweregrad des ersten Schlaganfalls oder Art des Schlaganfalls und sind am deutlichsten in Einheiten, die in einer separaten Schlaganfallstation untergebracht sind (Langhorne, Ramachandra et al. 2020). Jedoch liegt die Letalität in den ersten drei Monaten nach Eintreten des Schlaganfalls momentan immer noch bei 15% (Diener HC 2003). Laut einer Langzeitstudie hat ein Schlaganfall im jungen Alter (18-50 Jahre) in vielen Fällen lebenslange Folgen mit schweren Beeinträchtigungen, da diese Generationen sich noch aktiv in der Gesellschaft bewegen (Synhaeve, Arntz et al. 2016). Deswegen wird von einer hohen sozioökonomischen Belastung der Gesellschaft durch die Folgen eines Schlaganfalles gesprochen (Daffertshofer, Huang et al. 2004).

Um einen zweiten Schlaganfall zu verhindern wird nach Leitlinien der Deutschen Gesellschaft der Neurologie 2015 je nach Infarktursache eine Sekundärprophylaxe eingeleitet. In den meisten Fällen erhalten die Patienten im Anschluss ein

Thrombozytenaggregationshemmer (Acetylsalicylsäure) oder orale Antikoagulationen. Zusätzlich erfolgt die Gabe eines Statins als Cholesterin- und Lipidsenker.

Da für die systemische Thrombolyse Kontraindikationen bestehen und die Thrombektomie nicht flächendeckend zur Verfügung steht und nur bei nachgewiesenem Gefäßverschluss möglich ist, ist die Suche nach alternativen oder komplementären Therapiemethoden weiterhin von großer Bedeutung.

Ratten in der Schlaganfallforschung

Vergleich der anatomischen Strukturen – Ratte versus Mensch

Viele Eigenschaften des menschlichen Schlaganfalls sind gut in Tiermodellen darstellbar. So können die meisten Mechanismen der Entstehung des Schlaganfalls, wie ischämischer Zelltod oder Zellstress nach der Ischämie und die Ausbildung der ischämischen Penumbra in diesen Modellen beobachtet werden. Drei Charakteristika allerdings sind in der Forschung bis jetzt nicht im ausreichenden Maße berücksichtigt worden: Die kleinen Schlaganfälle, die Reperfusion und die Abläufe der Wiederherstellung geschädigten Gewebes (Carmichael 2005).

Das Gehirn einer Ratte ist dem menschlichen Gehirn sehr ähnlich (Lee 1995). Besonders die arteriellen Hirngefäße und deren Aufzweigungen weisen eine hohe Ähnlichkeit auf (Howells, Porritt et al. 2010). Auch aufgrund des Handlings eignet sich die Ratte sehr gut als Versuchstier. Durch die kleine Körpergröße sind alle physiologischen Parameter gut zu überwachen. Die kleinen Gehirne eignen sich gut zur Fixation und weiteren histologischen Untersuchungsprozessen. Es besteht eine relative Homogenität zwischen den Rattenarten und vor allem ist es einfach, reproduzierbare Versuche durchzuführen (Fluri, Schuhmann et al. 2015).

Werden in MRT- Aufnahmen die Lokalisationen eines Schlaganfalles kontrolliert, der durch den Verschluss der ACM (A. cerebri media) verursacht wurde, so findet man auch hier einige Ähnlichkeiten, die die Ratte als Forschungsobjekt geeignet erscheinen lassen. Wie auch beim Menschen verursacht der Verschluss der ACM Defekte in der grauen Substanz, den Basalganglien und den Bahnen der weißen Substanz. Dadurch entstehen neurologische Defizite, die durch klinische Untersuchung am Tier nachvollziehbar sind, wie zum Beispiel Hemiparesen, Sehstörungen oder Sensibilitätsstörungen (Howells, Porritt et al. 2010).

Wie der Mensch auch weisen die einzelnen Ratten und Rattenarten anatomische Unterschiede auf. So haben zum Beispiel Sprague-Dawley Ratten eine größere Varianz in der Infarktgröße als die Wistar – Ratten, da die Sprague-Dawley Ratten eine höhere Anzahl an Abzweigungen von der Arterie cerebri media haben (Howells, Porritt et al. 2010). Die Ratten können auch verschiedene Verbindungen im posterioren Bereich des Circulus arteriosus cerebri aufweisen, die die Schäden in der weißen Substanz beeinflussen (Lee 1995, Howells, Porritt et al. 2010). So ist die Wahl der Art der Tiere bei jeder einzelnen Studie neu zu bewerten. In dieser Studie wurden ausschließlich männliche Wistar-Unilever Ratten verwendet, da männliche Ratten nicht dem Einfluss eines Hormonzyklus unterliegen. Somit kann es zu keiner hormonellen Beeinflussung kommen.

Jedoch gibt es auch Unterschiede zwischen den Abläufen im menschlichen Gehirn und denen einer Ratte und deren Verhalten bei einem Infarkt. So belegen Studien, dass bei Ratten weniger intrazerebrale Blutungen als beim Menschen vorkommen. Besonders auffällig ist dies bei Versuchen mit fibrinolytischen Therapien (Nedelmann, Ritschel et al. 2010). Auch wurde gezeigt, dass die Anzahl der sich möglicherweise bildenden Kollateralen zwischen der Arteria cerebri anterior und der Arteria cerebri media in Ratten vier bis fünfmal höher ist als beim Menschen (Lee 1995). Menschen besitzen noch eine zusätzliche Verbindung zwischen den beiden Hemisphären, die A. communicans anterior. Ist diese allerdings nicht vorhanden, so ist das Risiko einen Schlaganfall zu bekommen höher und das Risiko für einen malignen Infarkt steigt (Howells, Porritt et al. 2010).

Die Schlaganfallmodelle

Experimentell wird ein ischämischer Schlaganfall durch transienten oder permanenten Verschluss eines Hirngefäßes erzeugt. In der Regel wird hierfür die A. cerebri media (ACM) gewählt (middle cerebral artery occlusion, MCAO), da dies der am häufigsten vorkommende Infarkt beim Menschen ist und die Operation vergleichsweise einfach ist. Dies führt zu einem Infarkt, der die Basalganglien, die graue Substanz und die Bahnen der weißen Substanz betrifft (Howells, Porritt et al. 2010). Hierfür sind einige verschiedene Modelle bekannt.

Diese Modelle, wurden erstmals 1986 von Koizumi et. al. beschrieben (Koizumi 1986) und seitdem kontinuierlich weiter entwickelt, um Subarachnoidalblutungen und verfrühte Rekanalisation zu reduzieren, in dem man zum Beispiel die Fäden mit Silikon überzogen hat (Carmichael 2005).

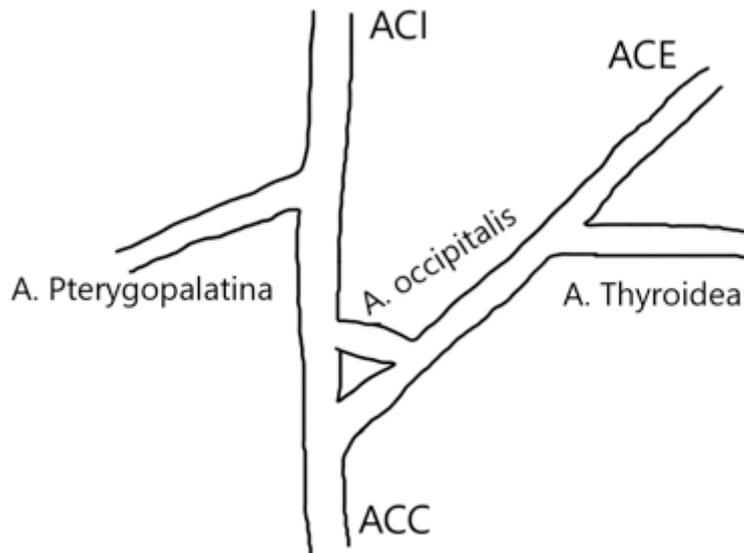


Abb.3: Aufzweigungen der Arteria Carotis Communis bei der Ratte.

Beim sogenannten Fadenmodell wird die ACM verschlossen, indem man einen Faden direkt in die ACI (Arteria Carotis Interna) einführt. Der Faden wird dann weiter vorgeschoben und verschließt somit die ACM. Man kann den Faden auch über einen ACE (Arteria Carotis Externa) - Stumpf bis in die ACI schieben. Diese alternative Methode eignet sich besser für eine vorübergehende Okklusion, da hier die anatomischen Strukturen für die nötige Reperfusion bestehen bleiben (Fluri, Schuhmann et al. 2015). Reperfusion wird meistens nach 60, 90 oder 120 min durchgeführt, indem der Faden aus dem Gefäß entfernt wird (Carmichael 2005). Zur dauerhaften Okklusion des verschlossenen Gefäßes kann der Faden aber auch an Ort und Stelle belassen werden. Die Erfolgsquote eines induzierten Schlaganfalls liegt bei 88% bis 100%. Je nachdem wie lange der Faden das Gefäß verschließt, bekommt das Tier einen territorialen Infarkt, der das Striatum, den vorderen parietalen und den temporalen Cortex, sowie einige Teile des occipitalen Cortex und auch den Thalamus und den Hypothalamus einschließen kann. Das läuft nach einem bestimmten Schema ab. Zuerst kommt es zur einer frühen Ischämie des Striatums, welche dann von den späteren Infarkten der Großhirnrinde überlagert wird. Im Gegensatz zum Cortex kann das Striatum keine Kollateralen mit dem umliegenden vaskulären Gebiet bilden, sodass der zerebrale Blutfluss reduziert bleibt (Fluri, Schuhmann et al. 2015).

Bei dem sogenannten Thrombemboliemodell wird ein Katheter über den Externa-Stumpf in die ACI eingeführt. Durch diesen Katheter werden ein oder mehrere zuvor hergestellte Thromben in die weiter distal gelegenen Hirngefäße gespült. Dieser Verschluss der

hirnversorgenden Gefäße ist prinzipiell irreversibel, jedoch kommt es durch endogene Thrombolyse trotzdem in manchen Fällen zur Reperfusion. Da der Thrombus je nach Dicke und Beschaffenheit an unterschiedlichen Stellen im Gefäßsystem stecken bleibt, ist die Lokalisation der Schlaganfälle sehr unterschiedlich. Die Infarkte in diesem Modell können kleiner und variabler sein als beim Fadenmodell (Carmichael 2005). Durch eine direkte Applikation des Katheters in die mittlere zerebrale Arterie erhält man mehr Kontrolle über den Thrombus und seine Lage (Howells, Porritt et al. 2010). Man kann verschiedene Arten von Thromben zum Verschluss des Gefäßes einsetzen. Es gibt plättchenreiche Thromben, Vollbluthromben und erythrozytenreiche Thromben. Anstelle von Blut kann man auch Makrosphären benutzen (Gerriets, Li et al. 2003). Hierbei wird die intraarterielle Embolisation mit sechs TiO₂-Makrokugeln (0,3-0,4 mm Durchmesser) herbeigeführt. Das Makrosphären Modell induziert eine reproduzierbare fokale zerebrale Ischämie, ähnlich wie die anderen beiden Methoden, vermeidet jedoch Schäden des Hypothalamus und Hyperthermie (Gerriets, Li et al. 2003).

Der am häufigsten untersuchte Endpunkt tierexperimenteller Schlaganfallstudien ist die Reduktion der Größe des Infarkts. Funktionelle Defizite werden nur selten systematisch erfasst. Meist werden auch die Tiere nach kurzer Zeit getötet. Aber gerade bei der Motorik, Sensibilität und Sprachentwicklung nach einem Schlaganfall werden progressive Reorganisation und Erholung der zuvor geschädigten Gebiete mit einbezogen und spielen in erfolgreichen Rehabilitationsprogrammen eine wichtige Rolle. Diese Prozesse benötigen jedoch Zeit. Schlaganfall-Tiermodelle sollten Verletzungen in definierten Hirnkreisläufen erzeugen, um die molekularen und zellulären Ereignisse zu identifizieren, die eine Reorganisation und Erholung in den verschonten Kreisläufen in der Nähe des Infarktes bewirken (Carmichael 2005).

Ultraschallbehandlung beim Schlaganfall (Sonothrombolyse)

Allgemein

Die genaue Wirkweise der Sonothrombolyse ist noch nicht vollständig verstanden. Der Ultraschall scheint zum einen direkte Effekte auf den Thrombus zu haben. So wurde nachgewiesen, dass Ultraschall in der Thrombusstruktur zu einer kurzzeitigen reversiblen Unterbrechung der vernetzten Fibrinfäden führt (Alexandrov, Molina et al. 2004). Fibrinfäden werden durch aktivierte Thrombozyten zusammengehalten und bilden eine Art Fischernetz, das rote Blutkörperchen abfängt. Die Öffnungen in dieser Art von Netz sind

kleiner als 6 µm. Ultraschall vergrößert diese Öffnungen (Alexandrov 2009). So können zusätzlich verabreichte Fibrinolytika oder Kontrastmittel besser und schneller in den Thrombus eindringen (Eggers, Koch et al. 2003, Damianou, Hadjisavvas et al. 2014) und im Inneren des Blutgerinnsels binden, um so die Struktur des Fibrinnetzes dauerhaft zu lockern. Dadurch wird die Oberfläche des Thrombus vergrößert und die Anzahl der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen nimmt zu (Daffertshofer, Huang et al. 2004, Daffertshofer, Gass et al. 2005, Nedelmann 2010, Aaron, Mani et al. 2017, Masomi-Bornwasser, Winter et al. 2017).

Die Steigerung der lokalen Autofibrinolyse spielt aber nur eine minimale Rolle in der Thrombusauflösung ohne rt-PA (Topcuoglu, Saka et al. 2006), eine größere Rolle spielen die akustischen Kavitationen und die sonochemikalischen Prozesse. Deswegen wird als wichtigster Aspekt das Entstehen von sogenannten Kavitationen angesehen. Hierbei handelt es sich um Wechselwirkungen zwischen umgebender Flüssigkeit und gelösten Gasbläschen. Der Ultraschall führt zu einem dazu, dass die Gasbläschen in Schwingung versetzt werden und hierdurch Mikroströmungen hervorgerufen werden, die dazu führen sollen, dass gelöste Stoffe (resp. rt-PA) besser in den Thrombus aufgenommen werden (sog. stabile Kavitationen). Zum anderen können sich die Gasbläschen durch den Ultraschall schnell ausdehnen und dann schlagartig zusammenfallen, was zu einer starken Mikroströmung führt und so einen direkten Effekt auf die Umgebung hat (sog. inerte oder kurzlebige Kavitationen). Dadurch wird die Bewegung von Flüssigkeit außerhalb des Thrombus verstärkt (Damianou, Hadjisavvas et al. 2014). Die Größe der Gasbläschen steigt mit der Menge der zugeführten Energie durch kurzlebige Kavitation und bringt sie zum Vibrieren und Platzen. Das findet sowohl an der Oberfläche als auch im Inneren des Thrombus statt. Dieser wird dadurch fragmentiert und aufgelöst. Unterschiedliche Einstellungen der Ultraschallgeräte bedingen, dass es in einigen klinischen Studien zu unvollständigen Rekanalisationen kam (Topcuoglu, Saka et al. 2006, Aaron, Mani et al. 2017). Bei den Kavitationseffekten handelt es sich um dosisabhängige Effekte, die von Schallfrequenz und Pulsdauer abhängig sind. Außerdem führt der Ultraschall zu einer lokalen Erwärmung des Gewebes, was einen unerwünschten Effekt darstellt (Siddiqi, Odrlijin et al. 1998) .

Die durch die kurzlebige oder inerte Kavitation erhöhte lokale Temperatur führt zur Freisetzung von Radikalen und Sonochemikalien, die das Gehirngewebe und das Gefäßendothel schädigen (Topcuoglu, Saka et al. 2006). Nedelmann et.al. aus dem Jahre 2004 und 2010 beschreibt jedoch, dass es zu keiner Steigerung der intrakraniellen Temperatur

kommt. Allerdings wurden diese Studien an einem Tiermodell durchgeführt. Es sind keine Schädigungen des Gewebes magnetresonanztomographisch oder histologisch zu erkennen (Nedelmann, Brandt et al. 2005, Nedelmann 2010). So ist auch bei Mikulik et.al. aus dem Jahre 2006 zu lesen, dass es zu einem geringeren Risiko von systemischen Blutungskomplikationen führt, wenn der Ultraschall als zusätzliche Therapie eingesetzt wird (Mikulik and Alexandrov 2006).

Experimentelle Untersuchungen

Der Erfolg einer Rekanalisation mit rt-PA hängt davon ab, wie schnell das Medikament am Thrombus ankommt (Alexandrov, Molina et al. 2004). Durch Ultraschall könnte dieser Prozess beschleunigt werden. Schon seit den 1970ern ist bekannt, dass Ultraschall den Vorgang der Thrombolyse verbessert und beschleunigt (Damianou, Hadjisavvas et al. 2014). Es konnte, wie oben schon beschrieben, gezeigt werden, dass durch Ultraschall als Monotherapie Thromben aufgelöst werden können (Nedelmann, Brandt et al. 2005). In der Kombinationstherapie mit rt-PA wird eine signifikant höhere Lyserate erreicht und die Größe des Thrombus reduziert sich nach einmaliger Therapie um bis zu 70% (Masomi-Bornwasser, Winter et al. 2017). In einer Einzelstudie konnte gezeigt werden, dass die Patienten ein deutlich besseres funktionelles Behandlungsergebnis bei Kombination von Ultraschall mit rt-PA haben (Nedelmann, Brandt et al. 2005). In experimentellen Modellen wurde gezeigt, dass Ultraschall innerhalb von Minuten nach der Verabreichung die Aktivität von fibrinolytischen Wirkstoffen auf einen Thrombus erhöht (Alexandrov, Molina et al. 2004). Zusätzlich fördert es den Stofftransport im Blut, verändert die Struktur von Fibrin und verstärkt die Bindung von endogenem rt-PA an Fibrin (Alexandrov, Molina et al. 2004). Dadurch wird das Eindringen von rt-PA in den Thrombus leichter und das Blutgerinnsel kann schneller aufgelöst werden, was zu einer schnelleren Eröffnung des Gefäßes führen kann (Nedelmann, Gerriets et al. 2008). Auch gibt es von Disharoon et.al. aus dem Jahre 2019 eine neue Untersuchung zu echogenen Liposomen. Diese setzen das fibrinolytische Agens nur nach Ultraschall Applikation frei und wirken 15% schneller als freies t-PA. Auch hier zeigt der Einsatz von Ultraschall in Kombination mit Fibrinolytika eine positive Wirkung (Disharoon, Marr et al. 2019). Erste Studien zur Wirkung des therapeutischen Ultraschalls beim Schlaganfall fanden in den 90er Jahren statt (Nedelmann 2010).

Die Applikation von Sonothrombolyse ist nicht invasiv und ohne Hilfsmittel anwendbar (Mikulik and Alexandrov 2006). Doppler- und Farbduplexgeräte (TCD und TCCS) und rt-PA

als momentane Standardtherapie sind auf jeder Stroke Unit vorhanden. Diese Behandlungsmethode könnte auch schon während des Transportes des Patienten in die Klinik eingesetzt oder bei einer Überführung des Patienten in eine andere Klinik weitergeführt werden. Zur Behandlung können die in der Routinediagnostik verwendeten Geräte benutzt werden (Barlind, Tsivgoulis et al. 2014). Es besteht keine Gefahr der Ruptur des Gefäßes und kann auch für Gefäße benutzt werden, die zu schmal für eine mechanische Rekanalisation sind (Everbach and Francis 2000). Der Einsatz der Sonothrombolyse ist einfach und schnell erlernbar. Verschlussene Gefäße lassen sich mit dem Farbdoppler zumeist einfach darstellen, um die Lokalisation der Applikation zu bestimmen (Nedelmann 2010). Es würde sich somit um eine einfach durchzuführende, schnell verfügbare und kostengünstige Therapiemethode handeln.

Bei einigen Patienten wird ein Reperfusionstrauma nach Therapie mit Ultraschall beobachtet. Durch die Sonothrombolyse kommt es zu einer beschleunigten Rekanalisation und die Gefahr einer intrazerebralen Blutung nimmt zu (Eggers, König et al. 2008). Auch bei Mosami-Bornwasser aus dem Jahre 2017 werden Ödeme im Gehirn, intrazerebrale Blutungen und Störungen der Blut-Hirn-Schranke, sowie Gewebnekrosen beschrieben (Masomi-Bornwasser, Winter et al. 2017). Eine Studie von Daffertshofer aus dem Jahre 2005, kam zu dem Ergebnis, dass mechanische Aktionen des Ultraschalls, zum Beispiel durch Reißen von kleinen Gefäßen im subarachnoiden Raum, zu Subarachnoidalblutungen führen können (Daffertshofer, Gass et al. 2005).

Die Wirksamkeit des therapeutischen Ultraschalls wurde in tierexperimentellen Studien gezeigt. Jedoch konnten mehrere randomisierte klinische Studien keinen Nutzen der Therapie auf das funktionelle Ergebnis nachweisen, es wurden teilweise sogar, wie auch schon beschrieben, vermehrt intrazerebrale Blutungen beobachtet (Daffertshofer, Gass et al. 2005). Bei einer der größeren Studien, der CLOTBUST-Studie (Combinded Lysis of Thrombus in Brain Ischemia), wurden 127 Patienten mit rt-PA alleine oder rt-PA und Ultraschall behandelt (Alexandrov, Wojner et al. 2004). Die Rate an intrakraniellen Blutungen war in beiden Gruppen vergleichbar, in der mit Ultraschall behandelten Gruppe wurde eine erhöhte Rekanalisationsrate beobachtet. Bezüglich der klinischen Endpunkte zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in beiden Gruppen, es gab lediglich einen Trend zu einem besseren funktionellen Resultat in der mit Ultraschall behandelten Gruppe. Eine kürzlich veröffentlichte post hoc-Subgruppenanalyse der Studie konnte bei insgesamt 95 Patienten zeigen, dass es bei den zusätzlich mit Ultraschall behandelten Patienten häufiger zu einer

vollständigen Rekanalisation kam und nach drei Monaten ein größerer Anteil an Patienten nicht pflegebedürftig war. Auch in der Subgruppe war der Anteil an symptomatischen intrakraniellen Blutungen vergleichbar (Barlind, Tsivgoulis et al. 2014). Bei dem TRUMBI (Transcranial Low-Frequency Ultrasound-Mediated Thrombolysis in Brain Ischemia) Trial dagegen wurde die Studie abgebrochen, da es in der Therapiegruppe rt-PA plus Ultraschall zu einer erhöhten Rate an Blutungen kam (Daffertshofer, Gass et al. 2005). Auch zwei kleinere Studien (n=15 und n=37) konnten eine höhere Rekanalisationsrate und ein besseres klinisches Resultat in der Gruppe, die mit Ultraschall und rt-PA behandelt wurde, nachweisen, jedoch wurde in beiden Studien ein Trend zu einer erhöhten Rate an intrakraniellen Blutungen beobachtet (Eggers, Koch et al. 2003, Eggers, König et al. 2008). In der CLOTBUST-ER Studie von Alexandrov wurden 335 Patienten mit vorheriger Alteplase Therapie entweder einer 120-minütigen Ultraschalltherapie (2MHz, mit Pulswelle) unterzogen oder als Kontrolle-Gruppe ohne Ultraschall therapiert. Das Ergebnis dieser Studie war, dass die Therapie gut durchführbar und sicher war, auch nach einer vorherigen intravenösen Thrombolyse. Allerdings konnte an Tag 90 keine klinische Verbesserung nachgewiesen werden. Daher wurde die Studie wegen Nutzlosigkeit eingestellt (Alexandrov, Köhrmann et al. 2019). Ferner ist anzumerken, dass alle bisherigen klinischen Studien ohne eine ausreichende präklinische Testung bezüglich Sicherheit und Wirksamkeit begonnen worden sind.

Diagnostischer Ultraschall – die Wahl der Parameter

Die Wahl der Parameter des Ultraschalls hat einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkungsweise des Ultraschalls. So wurden in den meisten Studien die Einstellungen des Ultraschalls für diagnostische Zwecke verwendet. Es würde jedoch Sinn machen, seinerseits Parameter zu bestimmen, die einzig für den Einsatz des Ultraschalls als Sonothrombolyse entwickelt wurden. So schwinden die thrombolytischen Eigenschaften mit steigender Ultraschallfrequenz (Nedelmann, Brandt et al. 2005). Es gibt bereits einige klinische Studien, die gezeigt haben, dass für die Therapie Ultraschall mit Frequenzen unter 1 MHz vielversprechender sind, als Frequenzen größer als 1,5 MHz. Frequenzen von 1,5MHz oder mehr werden für diagnostische Zwecke genutzt (Daffertshofer, Gass et al. 2005, Topcuoglu, Saka et al. 2006). Die meisten Studien benutzen Ultraschall im Megahertzbereich, um stehende Wellen zu vermeiden (Auboire, Sennoga et al. 2018). Eine präklinische Studie hat mit niedrigen kHz-Frequenzen gearbeitet. Bei diesen Einstellungen werden stehende Wellen

erzeugt, die zu Druckveränderungen führen, was wiederum die Kavitationsschwelle senkt. Als Nebenwirkungen wurden hierbei Ohrgeräusche beklagt und in danach durchgeführten MRT- Untersuchungen konnten vermehrte intrakranielle Blutungen festgestellt werden (Damianou, Hadjisavvas et al. 2014). Da es zu keiner deutlichen Verbesserung der Rekanalisationsrate geführt hat, wurde diese klinische Studie wegen Sicherheitsmängeln eingestellt (Mikulik and Alexandrov 2006). Nedelmann aus dem Jahre 2010 hat gezeigt, dass bei Ultraschall im Megahertzbereich keine mechanischen Scherkräfte und Kavitationen nachgewiesen werden konnten (Nedelmann 2010). Somit ist eine eigene thrombolytische Wirkung des Ultraschalls fraglich. Wahrscheinlicher ist eine mögliche Beschleunigung einer intrinsischen enzymatischen Fibrinolyse mit gewebeeigenem Plasminogen-Aktivator.

Zwei Studien (Frenkel, Oberoi et al. 2006, Lee, Yeh et al. 2017) haben sich bei der Sonothrombolyse auf fokussierten Ultraschall (FUS) konzentriert und kamen zu dem Ergebnis, dass diese Art von Ultraschall die bessere Methode ist als unfokussierter Ultraschall. So kam es in der Gruppe FUS plus rt-PA zu einer höheren Lyserate als bei anderen Ultraschallarten.

Zusätzlich muss man auch bedenken, wie weit die eingestellten Parameter den Ultraschall in das Gewebe eindringen lassen, da die Applikation von extern erfolgt. Allgemein ist bekannt, dass hohe Frequenzen eine geringere Eindringtiefe haben als niedrigere Frequenzen (Damianou, Hadjisavvas et al. 2014). Masomi-Bornwasser untersuchte im Jahre 2017, ob die Frequenz einen Einfluss auf die Lyserate hat. Heraus kam, dass 10 MHz Ultraschall die optimale Lyserate in Kombination mit rt-PA liefert (Masomi-Bornwasser, Winter et al. 2017). Das Ergebnis einer Studie von Daffertshofer aus dem Jahre 2004 hat gezeigt, dass bei einer niedrigen Frequenz und einer niedrigen Intensität des Ultraschalls eine Reduktion des Infarktolumens beobachtet wurde (Daffertshofer, Gass et al. 2005). Die Vorteile einer niedrigen Frequenz sind eine geringe Wärmeübertragung, sowie eine bessere Gewebe- und Knochenpenetration (Behrens, Daffertshofer et al. 1999). Besonders bei der transkraniellen Ultraschallapplikation ist das ein entscheidender Faktor. Allerdings kann es sekundär zu intrazerebralen Blutungen im Infarktgewebe kommen, die jedoch keine Auswirkung auf das funktionelle Outcome zu haben scheinen. Zusätzlich gibt es eine negative Korrelation zwischen steigender Frequenz des Ultraschalls und transkranieller thrombolytischer Effizienz (Behrens, Daffertshofer et al. 1999). Höhere Intensitäten führen zu einer höheren Volumenabnahme des Thrombus, aber auch zu einer Erwärmung, daher ist der Einsatz dieser

Parameter limitiert. Im Gehirn ist nur eine maximale Erwärmung um 1°C während der Therapie akzeptabel. Bei geringeren Intensitäten erhöht sich die Dauer der Therapie. Das wiederum kann auch ein limitierender Faktor sein, da ein Schlaganfall schnellstmöglich therapiert werden sollte (Damianou, Hadjisavvas et al. 2014). Bei der transkranialen Applikation von Ultraschall gehen 65-90% der Ultraschallenergie durch die Knochenpenetration verloren, was jedoch keinen Einfluss auf die Wirkung zu haben scheint (Alexandrov, Molina et al. 2004). In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass 2 MHz transkranialer Ultraschall mit Monitoring nach einer rt-PA Infusion zu einer kompletten Rekanalisation geführt hat und mit einem guten klinischen Outcome einherging (Alexandrov, Molina et al. 2004). Auch Eggers et.al. aus dem Jahre 2003 hat bestätigt, dass Ultraschallapplikation mit 2-4 MHz für eine Stunde in Kombination mit Alteplase zu einem besseren klinischen Outcome und zu einer schnelleren Rekanalisation geführt hat (Eggers, Koch et al. 2003). Jedoch kam es in beiden Studien zu vermehrten intraparenchymalen Blutungen. In in-vitro Modellen dagegen erreicht Ultraschall mit 10 Megahertz die besten Ergebnisse (Masomi-Bornwasser, Winter et al. 2017). Hier muss aber Rücksicht darauf genommen werden, dass es keine Nebenwirkungen auf einen lebenden Organismus geben kann und somit kann es nicht zu intrazerebralen Blutungen kommen.

Bracco 38 - Microbubbles in der Schlaganfalltherapie in Kombination mit Ultraschall

Es gibt bereits Untersuchungen dazu, dass ein Echokontrastverstärker bzw. Ultraschallkontrastmittel die beschriebene Wirkung des Ultraschalls unterstützen und verstärken kann (Auboire, Sennoga et al. 2018). Allerdings ist die Wirkungsweise eines Kontrastmittels in der Schlaganfalltherapie noch nicht vollständig verstanden. Untersucht worden sind zwei Mechanismen: Die Nitroxid- Freisetzung und die Dissolution von Mikrothromben könnten verantwortlich für die Verbesserung der mikrovaskulären Reperfusion sein (Mears, Alonso et al. 2012). Microbubbles (MB's) reduzieren den akustischen Druck, der für die Kavitation nötig ist und zerstören so mechanisch das Fibringeflecht. Die dadurch unterstützte Kavitation zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen den ultraharmonischen Signalen und der Abnahme der Masse des Thrombus (Datta, Coussios et al. 2008). Somit kann rt-PA auch an tieferen Bindungsstellen andocken und den Thrombus auflösen (Dixon, Rickel et al. 2018). In Verbindung mit Ultraschall lösen die MB's durch den zusätzlichen mechanischen Stress die Thromben auf (Lee, Yeh et al. 2017), da dieser sich positiv auf die Zerstörung des Thrombus auswirkt (Lu, Wang et al. 2016, Schleicher, Tomkins et al. 2016). Dadurch reduziert sich das Infarkt volumen (Schleicher,

Tomkins et al. 2016) und somit werden die neurologischen Ausfälle verringert (Lu, Wang et al. 2016). Jedoch ist auch bekannt, dass es eine unterschiedliche Wirkung auf unterschiedliche Thromben gibt. Nicht alle Arten der Thromben sind untersucht worden (Dixon, Rickel et al. 2018). Kontrastmittel mit 2 MHz Ultraschall ist an erythrozytenreichen und thrombozytenreichen Thromben getestet worden. Das Ergebnis war, dass beide Thromben Arten gleich schnell aufgelöst werden (Lu, Wang et al. 2016). Die Größe der MB's hat auch einen Einfluss auf die Wirkung. Je größer die MB's, desto schneller kommt es zu einer Rekanalisation (Dixon, Rickel et al. 2018). Schleicher aus dem Jahre 2016 hat dagegen rausgefunden, dass die Größe und die Dosis der MB's nicht entscheidend für die erfolgreiche Rekanalisation sind (Schleicher, Tomkins et al. 2016). Da die Thromben durch das Kontrastmittel aufgelöst werden, kann es nicht zu dem No-Reflow Phänomen kommen, da keine fragmentierten Thromben abgeschwemmt werden können (Lu, Wang et al. 2016). Das No-Reflow Phänomen besagt, dass obwohl eine Rekanalisation stattgefunden hat, es zu keiner klinischen Verbesserung kommt. Das kann daran liegen, dass keine adäquate mikrovaskuläre Reperfusion durch das Entstehen von einem kleineren Infarkt zustande gekommen ist.

Eine kürzlich durchgeführte tierexperimentelle Studie (Schleicher, Tomkins et al. 2016) konnte die Effektivität und Durchführbarkeit der Sonothrombolyse mit spezifisch definierten Ultraschallparametern in Kombination mit dem Echokontrastverstärker BR38 beweisen: Im Vergleich zur einfachen Monotherapie mit rt-PA wurde durch zusätzliche echokontrastverstärkte Sonothrombolyse eine frühere Rekanalisation erreicht. Gleichzeitig waren jedoch teilweise 24h nach der Behandlung mikroskopische Blutungen im beschallten Hirngewebe nachweisbar mit einer Größe von ca. 50µm. Eine funktionelle Auswirkung der Blutung wurde nicht beobachtet, nach 14 Tagen waren histologisch keine Mikroblutungen mehr sichtbar.

Auch andere Untersuchungen zeigten durch die gesteigerte Rekanalisationsrate ein erhöhtes Risiko für intrazerebrale Blutungen (ICH) und off-target Blutungen (Aaron, Mani et al. 2017, Dixon, Rickel et al. 2018). Eine Sonothrombolyse-Studie von Nedelmann aus dem Jahre 2010 hat ergeben, dass eine höhere Rate kompletter Rekanalisationen und dadurch signifikant verkürzte Behandlungszeiten vom Beginn der Behandlung bis zur vollständigen Rekanalisation, zu einer erhöhten Rate an Blutungen führen können (Nedelmann 2010).

Allerdings wurde meistens mit Ultraschallparametern für diagnostische Zwecke gearbeitet. Es bleibt also die Möglichkeit offen, Parameter des Ultraschalls für therapeutische Zwecke zu untersuchen, die die Rekanalisation erhöhen, aber die Gehirnblutungen minimieren (Dixon, Rickel et al. 2018).

Obwohl die MB's die Nebenwirkung der Kavitation des Ultraschalls verringert, wird es momentan nicht in der Klinik eingesetzt, obwohl kontrastverstärkter Ultraschall laut Nedelmann aus dem Jahre 2010 immer erfolgreicher ist, gerade in Kombination mit rt-PA (Nedelmann 2010). Es ist noch kein etabliertes Verfahren und außerdem sehr teuer. Es müsste über den gesamten Zeitraum der Therapie gegeben werden. Der Transport zum Ort des Geschehens ist schwierig, daher wird eine eventuelle intraarterielle Gabe empfohlen. Das ist aber, falls rt-PA zusätzlich verwendet wird, kontraproduktiv und die Sicherheit ist zu untersuchen, da es eine sehr lange Haltbarkeit im Blutkreislauf hat (Topcuoglu, Saka et al. 2006).

Rt-PA, Ultraschall und Microbubbles als Kombinationstherapie

Die Kombination aller drei Therapiemöglichkeiten stellt eine Therapiemöglichkeit dar, um eine komplette Rekanalisation zu erreichen (Lee, Yeh et al. 2017). Hierbei spielen alle drei vorher erwähnten Wirkungsweisen eine Rolle. Zusätzlich könnten so auch die Nebenwirkungen geringer ausfallen. So kann man in Kombination geringere Dosen des rt-PA verwenden und verringert so das Risiko für Gehirnblutungen (Datta, Coussios et al. 2008). Diese Studie hat gezeigt, dass so geringe Dosen wie 1,4 µg/ml von rt-PA erfolgreich waren, um die Thrombolyse mit MB's und Ultraschall zu verbessern. Auch zeigt dieses Therapieverfahren eine Alternative auf, wenn Kontraindikationen gegen eine alleinige rt-PA Therapie sprechen (Nedelmann, Ritschel et al. 2010).

So hat eine experimentelle Studie von Dixon aus dem Jahre 2019 untersucht, welche Wirkung eine direkte Applikation von MB's in die Arteria Carotis Externa in Kombination mit Ultraschall und rt-PA Gabe auf den Thrombus hat (Dixon, Li et al. 2019). In dieser Studie wurden besonders große MB's mit einem Durchmesser von 10 bis 20 µm Durchmesser verwendet und durch einen Katheter, der in der Arterie Carotis Externa lag, direkt in das Gefäßsystem eingespült. Diese Untersuchung hat ergeben, dass größere Gasbläschen verbesserte Bioeffekte haben und somit eine größere Wirkung besitzen (Dixon,

Li et al. 2019). Jedoch wurden in den meisten Studien bisher viel kleinere Bläschen benutzt, da man die Gefahr einer Gasembolie nicht eingehen wollte (Topcuoglu, Saka et al. 2006). Dixon haben daher Microbubbles mit einer kurzen Halbwertszeit entwickelt, die aus Gasen mit hoher Löslichkeit und einer schwachen Tensidhülle entstehen, um die Wahrscheinlichkeit einer Gasembolie zu senken (Dixon, Li et al. 2019). Das zerebrale Infarktvolumen wurde durch die Gabe von MB's im Vergleich zu der Kontrollgruppe um 50% gesenkt. Gleichzeitig hat man in der Behandlungsgruppe, die alle drei Therapien bekommen haben, die Dosis von rt-PA reduziert. Das Ergebnis dieser Studie hat hier ergeben, dass in etwa die gleichen reduzierten Infarktgrößen erreicht werden, wie bei einer Gabe der vollen Dosis von rt-PA.

Zielsetzung und Fragestellung

Ziel der Promotionsarbeit war es, am Tiermodell der Ratte die Sonothrombolyse weiter zu untersuchen und die Therapie mit einer Behandlung mit rt-PA zu kombinieren. Zusätzlich wurde noch die Kombination mit dem Mikrobläschenpräparat der Firma Bracco (BR38) untersucht. Die Untersuchung erfolgte an einem Modell eines embolischen Schlaganfalls durch einen Vollblutthrombus. Es wurde untersucht, in welcher Kombination der Therapiemöglichkeiten der Thrombus am besten aufgelöst wird und somit zu einem kleineren Hirninfarkt führt. Des Weiteren sollte die Sicherheit untersucht werden, da sowohl intrazerebrale Blutungen, Subarachnoidalblutungen, als auch subdurale Blutungen als Nebenwirkungen beschrieben werden.

Dies sollte durch Magnetresonanztomographische (MRT) Untersuchungen (blutungssensitive Sequenzen, diffusionsgewichtete Sequenzen und T2-gewichtete Sequenzen) und histologische Untersuchungen überprüft werden.

Aus dieser Fragestellung ergaben sich folgende Hypothesen:

1. Hypothese: Die Größe der Schlaganfälle nach der zweiten MRT Messung ist in der Gruppe mit der Therapie rt-PA, Ultraschall und BR38 (Kombinationsgruppe) am kleinsten.
2. Hypothese: Zunahme der Infarktgröße in der Kombinationsgruppe ist von erster MRT Messung zu zweiter MRT Messung am kleinsten.
3. Hypothese: Die Anwendung der Sonothrombolyse ist sicher.

Material und Methoden

Tierversuchsantrag

Beantragt und genehmigt wurde der Tierversuch unter der Nummer Gen. Nr. B 20/1120 am Regierungspräsidium Darmstadt.

Versuchstiere

In dieser Studie wurden 67 männliche Wistar-Unilever (WU) Ratten mit einem Gewicht von $288 \pm 24,81\text{g}$ verwendet. Bestellt wurden die Tiere bei Envigo RMS GmbH, In den Leppsteinswiesen 19, 64380 Roßdorf, DE und Charles River, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld, DE. Die Tiere wurden im Altbau des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim in Makrolon- Käfigen vom Typ IV zu jeweils vier Tieren untergebracht und von den Tierpflegern versorgt. Die Käfige waren mit Einstreu vom Typ Lignocel FS 14 eingestreut und die Tiere erhielten Zellstoff, Kauhölzer und Papprollen zur Beschäftigung. Als Alleinfuttermittel bekamen die Ratten Altromin ad libitum und Wasser zur freien Verfügung.



Abb.4: Ratte in einem Makrolon-Käfig von Typ IV.

Anästhesie und Überwachung während der Narkose

Zur Einleitung einer Inhalationsnarkose wurden die Tiere in eine Glasglocke gesetzt und die Narkose erfolgte mit 5% Isofluran in 2 l/min Sauerstoff. Im Anschluss erfolgte die

Überführung der Ratten auf eine Wärmeplatte, an der gleichzeitig eine Atemmaske zur Aufrechterhaltung der Narkose angebracht war. Die Erhaltung der Narkose erfolgte bei einer Isoflurankonzentration zwischen 1,8 und 2,5% in 0,5 l/min Sauerstoff. Die Isoflurankonzentration wurde innerhalb der genannten Grenzen unter Berücksichtigung physiologischer Parameter gesteuert. Die Temperatur wurde anfangs rektal gemessen und überwacht, dann mittels einer Wasserbad-geregelten Wärmeplatte konstant bei 37°C gehalten. Während der Narkose und der Dauer der Operation wurde regelmäßig die Atmung der Ratte kontrolliert und der Kreislaufzustand anhand der Färbung der Füße überprüft. Direkt nach dem Ablegen der Ratte wurde Augen- und Nasensalbe in beide Augen der Ratte gegeben.

Herstellung eines autologen Vollblut-Thrombus

Die Herstellung eines Vollblutthrombus erfolgte einen Tag vor der eigentlichen Operation. Zur Vorbereitung wurden zehn 15-cm lange PE-50 Katheter zugeschnitten und auf abgebrochene 23G-Kanülen mit 1ml Spritzen gesteckt. Es erfolgte die Punktion einer Schwanzvene in Narkose und die 10 Katheter wurden mit Blut gefüllt (siehe Abbildung5).

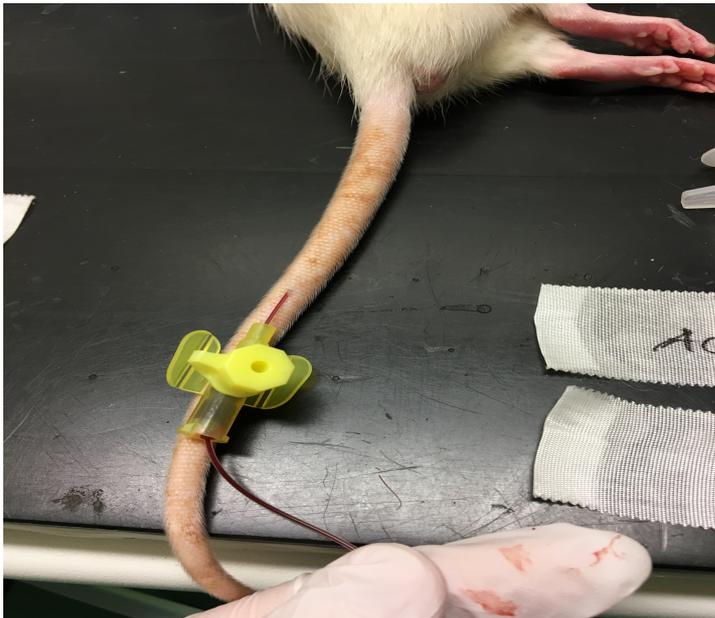


Abb. 5: Blutabnahme aus der *V. caudalis mediana* bei einer Ratte.

Hierbei wurde der Ratte circa 0,6ml venöses Blut entnommen. Die Katheter wurden zwei Stunden bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid in einem Inkubator (Hera Cell150, Thermo Scientific, GB) inkubiert. Danach wurden die Enden der Katheter abgeschnitten, um eventuelle Verklebungen am Rand zu entfernen und die entstandenen Thromben wurden mit Natriumchlorid Lösung (NaCl-Lösung) in ein Reservoir mit derselben Lösung ausgespült. Es

wurden möglichst zwei oder drei ausreichend lange und gleichmäßig dicke Thromben ausgewählt und die übrigen Thromben verworfen. Anschließend wurden die Thromben 24 Stunden im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Schmerzmanagement

Eine halbe Stunde vor dem Operationsbeginn wurde der Ratte in flacher Inhalationsnarkose 0,05mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Buprenovet) subcutan verabreicht. Während der Operation wurde den Tieren vor jedem Schnitt Lidocain-HCl B. Braun 2% subcutan verabreicht. Auch wurde den Tieren am Abend nach der Operation ein weiteres Mal Buprenorphin (Buprenovet) gespritzt, um den Schmerzmittelbedarf über Nacht abzudecken.

Thrombembolienmodell

Der erste Schritt des Operationsverfahrens war die Vorbereitung der Laser-Doppler-Untersuchung. Als erstes wurde die Ratte auf dem Kopf zwischen Augen und Ohren rasiert. Danach wurde mit einer dünnen Kanüle Lidocain-HCl B. Braun 2% subcutan verabreicht. Ein circa ein Zentimeter langer Schnitt der Kopfhaut auf der rechten Seite wurde durchgeführt. Danach wurde das Bindegewebe entfernt und der Schädelknochen freigelegt. Zur Vorbereitung der Stelle für den Laser-Doppler wurden zusätzlich zwei Haltefäden zum Aufspannen der Haut gelegt (siehe Abbildung 6). Anschließend wurde der Schnitt mit einer feuchten Gaze bedeckt und die Ratte in Rückenlage gebracht.

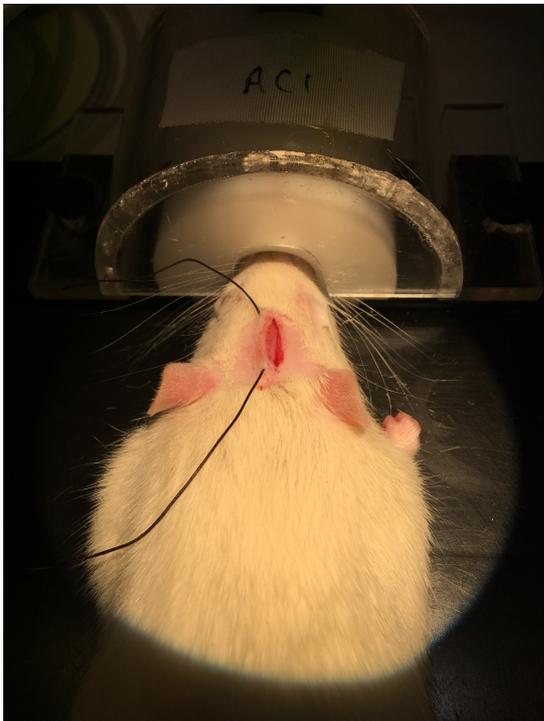


Abb.6: Hautschnitt zur Vorbereitung der Sonde des Laser-Dopplers.

Als nächstes wurde der Hals der Ratte zwischen Kiefer und Vorderbeinen rasiert. Nach der Applikation von Lidocain-HCl (B.Braun 2%) erfolgte ein circa zwei Zentimeter langer Schnitt median auf der rechten Halsseite. Nach dem stumpfen Trennen des Bindegewebes und der Muskulatur, kamen die rechtseitige ACC (A. carotis communis), ACI und ACE zum Vorschein. Es wurde ein Haltefaden um die ACC und ein Haltefaden um die ACI gelegt. Danach wurde die A. thyroidea, die als Abzweig der ACE weit rostral verläuft, aufgesucht und gekautert. Im Anschluss erfolgte die Kauterung der ACE. Zur Sicherstellung der Fixierung des ACE-Stumpfes wurde ein Haltefaden zur Befestigung angebracht und im Anschluss wurde dieser Stumpf nach distal gezogen. In der Bifurkation der ACC befindet sich die A. occipitalis, die ebenfalls gekautert wurde. Als nächster Schritt wurden die Haltefäden der ACC und der ACI gespannt und somit die Blutzufuhr unterbrochen. Danach wurde eine Querinzision in die ACE mit einer Mikrofederschere geschnitten. Das restliche Blut in den Gefäßen zwischen den Haltefäden entwich dabei. Um den Katheter sicher in das Gefäß schieben zu können, wurde das Loch mit einer Pinzette offen gehalten. Die sich linksabzweigende A. Pterygopalatina wurde mit einer Pinzette abgedrückt, um den Katheter in der ACI so weit wie möglich vorschieben zu können. Zur Fixation des Katheters wurde ein Faden um die ACE und ein Faden um die ACI gelegt und festgezogen (siehe Abbildung 7).



Abb.7: fixierter PE- 10 in der A. Carotis externa.

Im Anschluss wurden alle Haltefäden um die ACI und die ACC gelockert, die Wunde mit einer feuchten Gaze abgedeckt und die Ratte wieder in Bauchlage gebracht und anschließend

die Laser-Doppler-Sonde zwischen Bregma und Lamda-Naht positioniert (siehe Abbildung 8).

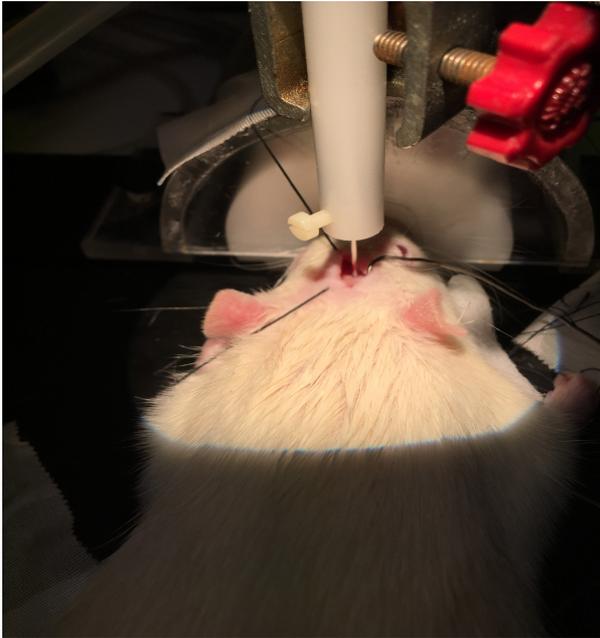


Abb.8: Lage der Dopplersonde auf der Schädeldecke.

Zur Kontrolle der Lage der Sonde wurde der Katheter mit Natriumchlorid (NaCl) gespült. Dies führte zu einem kurzen Anstieg des gemessenen Flusses. Die Lage der Sonde wurde zwei- bis dreimal durch erneutes Spülen des Katheters kontrolliert. Anschließend wurde der ausgewählte Thrombus auf eine Länge von vier Zentimeter gekürzt. Dann wurde er in einen zweiten PE-10 Katheter aufgezogen. Um die Oberfläche des Thrombus aufzurauen, wurde der Thrombus einige Male im Katheter hin- und her bewegt. Bei stabilem Baselinefluss des Dopplers wurde der Thrombus über die beiden verbundenen PE-10-Katheter mittels circa 10 μ l NaCl unter Monitoring des Blutflusses appliziert, um die Arteria Carotis Media zu verschließen. Eine erfolgreiche Ischämie wurde als Reduktion des Blutflusses auf 50-90% des Ausgangswertes angesehen. Danach erfolgte die 40-minütige Ischämie-Zeit. Sollte der Blutfluss währenddessen wieder über 50% des Ausgangswertes ansteigen, war es möglich in den ersten zwanzig Minuten nach Ischämieinduktion kurz mit NaCl nachzuspülen, um den Thrombus wieder an die richtige Stelle zu spülen.

Nach dem Ablauf der 40 Minuten wurde mit der Therapie begonnen.

Den Tieren wurde je nach Gruppe (siehe Abbildung 9) alle 5-10 Minuten NaCl, Actilyse oder Bracco 38 gespritzt. Die Tiere mit einer rt-PA - Gabe (Actilyse) erhielten zu Beginn einen 10% Bolus und im Anschluss alle zehn Minuten jeweils 18% der Dosis. 0,1 ml Bracco 38 wurde alle fünfzehn Minuten verabreicht. Die Placebogabe (NaCl) richtete sich nach der Gabe der jeweilig zu ersetzenden Substanz. Der 3-MHz diagnostische Doppler

Ultraschallkopf (Sonos 7500, Phillips Ultrasound, USA; Diagnose-Phased-Array-Prüfkopf mit 80 Elementen) wurde an der linken Seite des Kopfes der Tiere angebracht, sodass das komplette Gehirn abgedeckt wurde. Die transkranielle farbkodierte Duplexsonographie wurde kontinuierlich während der kompletten Dauer der Behandlung durchgeführt (B-Mode, Farbdopplerfunktionen eingeschaltet, ungefähre Größe der Farbbox: 4,9cm x 8,1cm). Bei den Tieren ohne Ultraschalleinsatz wurde der Ultraschallkopf entsprechend platziert, jedoch blieb das Gerät ausgeschaltet.

Randomisierung:

1. No treatment (rt-PA-Placebo + Microbubbles-Placebo)
2. Continuous Ultrasound + Microbubbles + rt-PA-Placebo
3. rt-PA + Microbubbles-Placebo
4. Continuous Ultrasound + Microbubbles + rt-PA

Zeitpunkt		Rt-PA/PA-Placebo	BR38/Placebo	BGA	Erledigt?
:	Uhr (Beginn der Behandlung)	µg (10%)	0.1ml	X	
:	Uhr (Beginn +10 Minuten)	µg (18%)	X	X	
:	Uhr (Beginn +15 Minuten)	X	0.1ml	X	
:	Uhr (Beginn +20 Minuten)	µg (18%)	X	Jetzt	
:	Uhr (Beginn +30 Minuten)	µg (18%)	0.1ml	X	
:	Uhr (Beginn +40 Minuten)	µg (18%)	X	Jetzt	
:	Uhr (Beginn +45 Minuten)	x	0.1ml	X	
:	Uhr (Beginn +50 Minuten)	µg (18%)	x	X	
:	Uhr Ende der Therapie (Beginn +60 Minuten)	x	x	Jetzt	

Abb.9: Zeitpunkte der Medikamentengabe. rt-PA: 10 mg/kg Körpergewicht, 10% als Bolus dann über eine Stunde jeweils 18 Prozent alle 10 Minuten. BR38: 0.1 ml Boli

Nach den 60 Minuten wurden die Braunüle, die Laser-Doppler-Sonde, der Ultraschallkopf und die Haltefäden entfernt. Der proximale Stumpf der ACE wurde ligiert und in der Muskulatur versenkt. Die Hautschnitte wurden mittels Naht (Perma-Hand-Seide 0, Ethicon) verschlossen und die Narkose beendet.

Randomisierung und Verblindung

Die Tiere wurden in die vier Behandlungsgruppen gleichermaßen aufgeteilt und randomisiert. Diejenigen Personen, die die Durchführung der klinischen Untersuchungen, sowie das Planimetrieren der MRT-Bilder, vorgenommen haben, waren für die Gruppenzuteilung verblindet.

Ein- und Ausschlusskriterien

Wie im Tierversuchsantrag definiert wurden folgende Abbruchkriterien beschrieben:

Wenn während der Operationen unstillbare Blutungen auftreten, wurde das Tier aus der Studie genommen. Wenn das Tier nach der Aufwachphase eine anhaltende Rotation um die Längsachse zeigte, konnte das ein Hinweis auf subdurale Blutungen sein. Das Tier wurde dann von seinem Leiden erlöst. Auch wenn nach der Aufwachphase, zwei, fünf oder vierundzwanzig Stunden nach der Operation das Tier auf der Seite lag und eine schwere Dyspnoe zeigte, wurde das Tier ausgeschlossen und der Versuch vorzeitig beendet.

Zusätzlich zu den Ausschlusskriterien wurden noch Einschlusskriterien definiert. Die Tiere sollten im MRT einen nachgewiesenen Verschluss der A. cerebri media haben. Zeigte sich ein Verschluss eines anderen Gefäßes oder war das Infarktgebiet zu klein, wurden die Tiere ebenfalls ausgeschlossen und als Modellversager notiert.

Neuroscore-Test

Der Neuroscore-Test diente der Überprüfung der klinischen und neurologischen Verfassung der Ratte. Da hierbei die Ratten sehr genau beobachtet werden konnten, war es möglich Verhaltensmuster und Symptome zu erkennen, die zu einem eventuellen Abbruch (siehe Seite 34 – Ein- und Ausschlusskriterien) der Studie bei einem einzelnen Tier führen konnten. Es wurden Reflexe und normale Verhaltensmuster überprüft und alles in einer Liste vermerkt. Für jedes physiologisches Verhaltensmuster gab es 0 Punkte, für abnormale Verhaltensmuster 5 oder 10 Punkte. Diese wurden zum Schluss addiert. Dieser Test wurde vor der Operation und 24 Stunden danach durchgeführt.

	Vor OP	1Tag post OP

Contralateral forelimb flexion:

Normal	0		
Flexion	10		

Instability to lateral push from right:

Normal	0		
Reduced	10		

Tail hanging:

Normal	0		
Upwinding to left	10		

Walking on ground:

Normal	0		
Abnormal (drifting/circling)	5		
Unable to walk	10		

Whisker movements on left:

Normal	0		
Absent	10		

Consciousness:

Normal	0		
No reaction to stimuli	10		

Hearing

Normal	0		
Unable	10		

Sensory:

Normal	0		
No reaction to left side touch	10		

Vision: Hemianopia:

Normal	0		
No reaction to threat from left	10		

TOTAL			
--------------	--	--	--

Abb.10: Neuroscore nach Nedelmann (Nedelmann, Wilhelm-Schwenkmezger et al. 2007) zur Beurteilung des akuten Schlaganfalles bei den Ratten.

Rotarod-Test

In diesem Test lief die Ratte auf einem selbstgebauten Rad bei ansteigender Geschwindigkeit. Die Geschwindigkeit wurde dabei kontinuierlich von 0 Runden pro Minute bis auf maximal 30 Runden pro Minuten erhöht. Es wurde der Wert notiert, bei dem die Ratte nicht mehr weiterlaufen wollte oder herunterfiel. Dieser Test diente vor allem dem Vergleich und der Überprüfung der Motorik, der Koordination und der Balance der Ratte. Auch dieser Test wurde ganz zu Beginn und ein zweites Mal nach 24 Stunden durchgeführt.

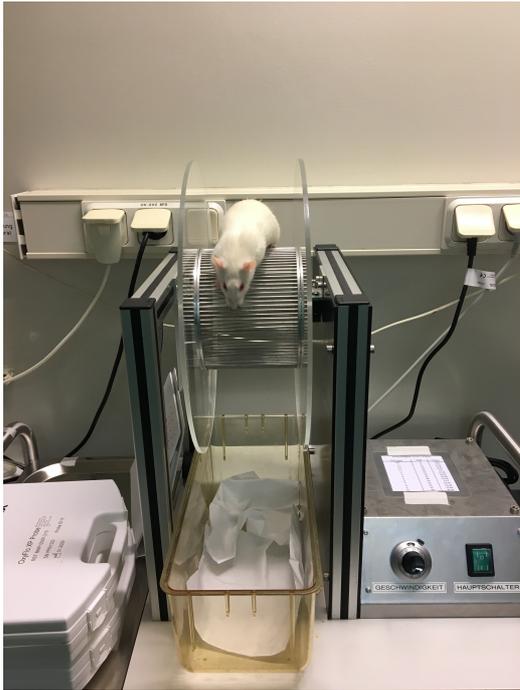


Abb.11: Ratte auf einem Rotarod-Rad nach Jones und Roberts (Jones and Roberts 1968).

Durchführung der Magnetresonanztomographie Messungen

Nachdem die Ratte in Narkose (5% Isofluran in 2-3 l/min Sauerstoff) gelegt wurde, wurde sie in eine speziell dafür gebaute Wiege gelegt und fixiert. Die Erhaltung der Narkose erfolgte mit 1-1,5% Isofluran in 0,5 l/min Sauerstoff. Die Körpertemperatur wurde mittels Rektalsonde durch ein Wasserbad konstant auf 37°C gehalten.

Die Wiege wurde nach Fixierung der Oberflächenspule auf dem Kopf der Ratte inklusive des Verstärkers in die MRT positioniert. Anschließend wurden verschiedene Sequenzen (siehe Kapitel MRT-Technik) zur Darstellung des ischämischen Infarkts gefahren.

Nach Beendigung der letzten Sequenz wurde die Ratte wieder aus der Wiege genommen und zurück in ihren Käfig verbracht.

Am nächsten Tag wurde zur Kontrolle des Verlaufs des Schlaganfalles eine zweite MRT gefahren.



Abb.12: 7T-Magnetresonanztomographie des Max-Planck-Institut in Bad Nauheim, DE.

MRT-Technik

Grundlagen

Im MRT wird mit einem supraleitenden Draht ein starkes Magnetfeld hergestellt. Die Protonen, die sich im körpereigenen Magnetfeld um die eigene Achse drehen, werden durch ein äußeres Magnetfeld zu Ausweichbewegungen verleitet und es kommt zu einer Änderung der Rotationsachse. Die im Körper enthaltenen Wasserstoffmoleküle werden durch das Magnetfeld des MRTs resonant angeregt und die Protonen ordnen sich dadurch parallel oder antiparallel im Magnetfeld an. Werden nun durch Hochfrequenz-Impulse (Radiofrequenz-Impuls, RF-Puls) die Magnetfelder gestört, wechselt diese Längsmagnetisierung zu einer Quermagnetisierung. Dieses ist als MRT-Signal messbar und kann von einem Computer weiterverarbeitet werden. Die Protonen springen im Anschluss in ihre Ausgangsform zurück und geben Energie in Form einer Radiowelle wieder ab. Das wird als Relaxation bezeichnet. Die Relaxationszeit ist die Zeit, die die Protonen brauchen, um wieder in ihren Ausgangszustand zurückzukehren. Hierbei werden zwei verschiedene Komponenten unterschieden: Die T1- oder auch longitudinale Relaxationszeit und die T2- oder auch transversale Relaxationszeit. Bei der T1-Zeit regen RF-Pulse die parallel angeordneten Spins an, so dass sie auf eine andere Ebene springen – Spin-Gitter Relaxation. Die angeregten Spins geben dabei Energie an das Kristallgitter ab. Die Geschwindigkeit, mit der dieser Prozess stattfindet, wird T1-Zeit genannt. Bei der T2-Zeit dagegen werden die Spins

entgegen der Richtung des Magnetfeldes angeordnet – Spin-Spin Relaxation. Es wird die Zeit gemessen, die sie brauchen, um in ihren Ausgangszustand zurückzukommen. Bei der Spin-Spin Relaxation ändert sich die Energie der Spins nicht, sie wird nur umverteilt und homogenisiert.

Je nachdem wie viele Signale die unterschiedlichen Gewebe aussenden, stellen sie sich in der MRT hypointens (dunkel) oder hyperintens (hell) da.

Weitere wichtige Begriffe in der MRT sind die Repetitionszeit (TR) und die Echozeit (TE). Die Repetitionszeit ist die Zeit zwischen zwei sich wiederholenden Pulsen. Die Echozeit beschreibt die Zeit zwischen dem Höhepunkt des RF Puls und dem Echo. Sie kann sehr unterschiedlich sein. Zur Einstellung der unterschiedlichen Sequenzen wird noch die zu messende Schichtdicke, das Field of View (FOV) und die Matrixgröße bestimmt.

Position und Lage der Ratte im MRT

Zur Überprüfung der Lage der Ratte im Magnetfeld wurde ein MSME_TriPilot mit einer Repetitionszeit von 205 ms, einer Echozeit von 10 ms und einer Schichtdicke von 5mm gefahren. Zur Bestimmung des Messfeldes wurden drei RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) Sequenzen in verschiedenen Ebenen (Sagittal, Coronal, Transversal) gefahren. Die verwendete Technik war eine T2-gewichtete Sequenz mit einer TE von 36,72 ms, einer TR von 2500 ms und einer Schichtdicke von 1 mm.

Wichtige MRT Sequenzen

Zur Darstellung und Beurteilung des Infarktareals wurden DTI- und T2-gewichtete Sequenzen durchgeführt.

Mit den T2-gewichteten Sequenzen wurden Protonen am besten dargestellt. Somit ließen sich Infarktareale, die Penumbra, Ödeme und Ergussbildungen besonders gut darstellen. Gemessen wurde mit folgenden Einstellungen: TE = 18ms, TR = 3800ms, Schichtdicke = 1mm, Matrixgröße = 512 x 256 Pixel und FOV = 35 x 35 mm.

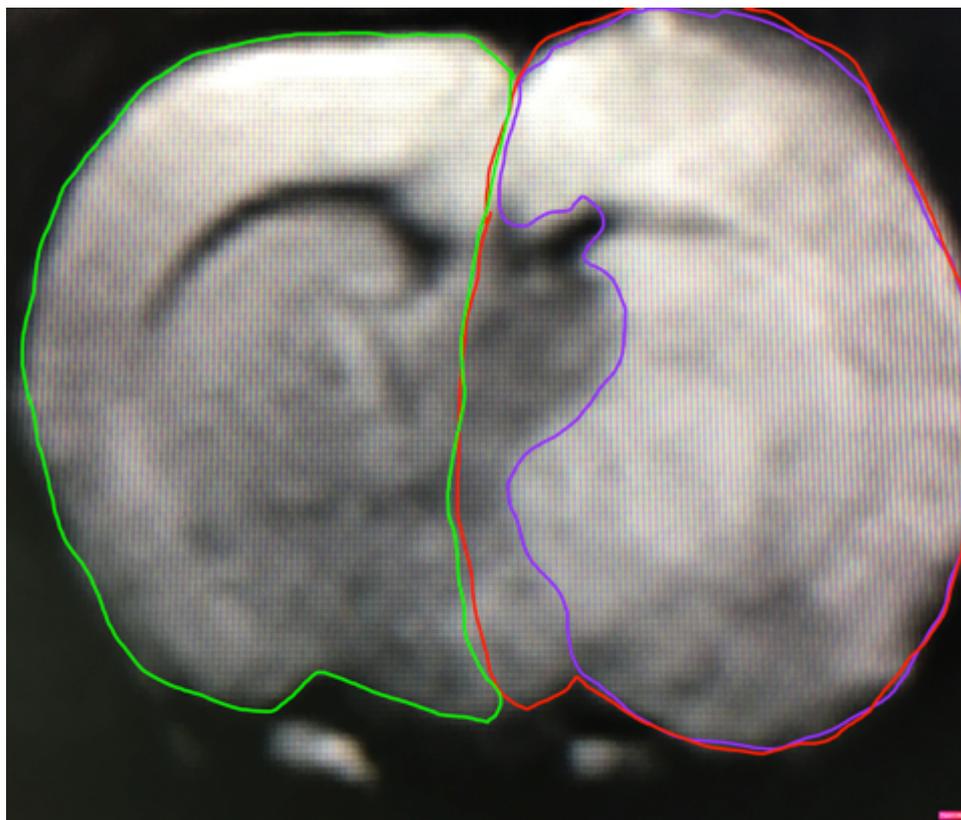
Die diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie stellte die Bewegung der Wassermoleküle im Gewebe dar. Speziell nach einem Schlaganfall konnte es zu Diffusionsstörungen kommen, die bereits nach kurzer Zeit im Gewebe sichtbar waren. Die folgenden Einstellungen waren dafür charakteristisch: TE = 43ms, TR = 3000ms, Schichtdicke = 2mm, Matrixgröße = 128 x 128 Pixel und FOV = 35 x 35mm.

Gearbeitet wurde mit folgenden Einstellungen der Sequenzen: TE = 2600ms, TR = 10ms, Schichtdicke = 0,800mm, Matrixgröße = 256 x 256 Pixel und FOV = 35 x 35mm.

Die suszeptibilitätsgewichtete Bildgebung (Saver, Goyal et al.) ist ein Verfahren zur Darstellung des venösen Blutsystems. Sie basiert auf der magnetischen Suszeptibilität. Hiermit konnten vor allem Blutungen, Stauungen und Ablagerungen von Hämosiderin dargestellt werden. Die SWI- Flash Sequenz wurde mit einer TR von 720ms, einer TE von 18ms, einer Schichtdicke von 1mm gefahren. Das FOV betrug 35 x 35mm und die Matrixgröße 384 x 384 Pixel.

Auswertung

Die MRT-Sequenzen wurden zur Bestimmung verschiedener Parameter genutzt. Zur Bestimmung der Schlaganfallgröße und der Mikroblutungen wurde der Phillips Dicom Viewer 2.0 verwendet. Die ipsilaterale Gehirnhälfte und die contralaterale Gehirnhälfte sowie das Infarktareal wurden in den Sequenzen der Ödem- und Diffusions-gewichteten Sequenzen planimetriert.



*Abb. 13: Darstellung eines ausgemessenen Gehirns einer Ratte.
Rot eingekreist: ipsilaterale Hemisphäre
Grün eingekreist: contralaterale Hemisphäre
Lila eingekreist: Ischämisches Areal*

Mit dem SWI-Flash (MRT-Messung) wurden die eventuell vorhandenen Mikroblutungen bestimmt und gezählt.

Unkorrigiertes Volumenverhältnis

Bei akuten Hirninfarkten führt ein Zufluss von Wasser aus dem Gefäßsystem in das Gewebe zu einer Netto-Volumenzunahme des Infarktgebietes. Unter der Annahme, dass die ipsilaterale Gehirnhälfte sich im gleichen Maße ausdehnt, wie sich die contralaterale Gehirnhälfte komprimiert, da der Schädel ein geschlossenes System darstellt, lässt sich das Volumen berechnen. Die prozentualen Volumenangaben beziehen sich dabei immer auf das Volumen einer Hemisphäre (Gerriets, Stolz et al. 2004, Walberer, Stolz et al. 2006).

Damit ergibt sich ein prozentual unkorrigiertes Volumenverhältnis:

$$\%HLVu = \frac{2 * LVu}{HVC + HVi} * 100$$

(*HLVu*: unkorrigiertes Hemisphärenläsionsvolumen in %, *LVu*: unkorrigiertes Läsionsvolumen, *HVC*: contralateres Hemisphärenvolumen, *HVi*: ipsilaterales Hemisphärenvolumen)

Töten der Tiere und Entnahme des Gehirns

Die Tötung erfolgte in tiefer Inhalationsnarkose nach dem Auftreten einer Schnappatmung mittels Dekapitation. Anschließend wurde das Gehirn entnommen.



Abb.14: entnommenes Rattengehirn eingelegt in 4% Formalin.

Herstellung und Beurteilung der histologischen Präparate

Die entnommenen Gehirne wurden in Formaldehyd (Histofix 4%, Firma Roth) konserviert, in Paraffin eingebettet und nach Trocknung geschnitten. Die Schnitte wurden entfettet, mit H &

E- gefärbt und mikroskopisch auf Mikroblutungen untersucht. Die Auswertung erfolgte am Computer mit einer Software (ZEN-Blue 2.6 Edition, Zeiss).

Statistik

Für die statistische Beurteilung der Ergebnisse wurden die Datenanalyseprogramme SPSS (IBM, Armonk, NY, USA), JASP (University of Amsterdam, Amsterdam, NLD) und Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) herangezogen. Zur Beurteilung der gesammelten Daten wurde die deskriptive Statistik herangezogen. Die Gruppenvergleiche mit Messwiederholungen wurden mit festen Effekten und geschätzten Randmitteln durchgeführt. Die Varianzhomogenität wurde mit der Analyse von gemischten Modellen überprüft und die Normalverteilung mit den Residuen dargestellt. Bei einem gemischten Model werden feste und zufällige Modelle gleichzeitig verglichen. Um die Verteilung der Häufigkeiten in den Behandlungsgruppen zu überprüfen, wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet.

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben und ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant angenommen.

Ergebnisse:

Klinische Befunde

Bei dieser Studie wurden von 67 Tieren 20 (29,85%) in die Auswertungen eingeschlossen. 22 Tiere (32,84%) sind während des Versuchs vorzeitig verstorben. Davon sind 12 Tiere (17,91%) vor oder während der Therapie gestorben und 10 Tiere (14,93%) in der ersten Nacht nach der Operation.

Bei 20 Tieren (29,85%) wurde ein Modellversagen festgestellt. Die Tiere wurden nach den oben beschriebenen Ein- und Ausschlusskriterien bewertet. Das führte dazu, dass bei 5 Tieren (7,46%) der Versuch vorzeitig beendet worden ist.

Für die Verteilung der überlebten Tiere siehe Tabelle 1.

Gruppe	Anzahl der überlebten Tiere
Placebogruppe	3
US, BR38 - Gruppe	6
rt-PA - Gruppe	6
Kombinationsgruppe (US, BR38, rt-PA)	5

Tabelle 1: Verteilung der überlebten Tiere aufgeteilt in die Behandlungsgruppen

Von den zwölf Tieren, die während der Operation verstorben sind, waren sieben Tiere aus der Placebogruppe (58,4%), ein Tier aus der Ultraschall, Br38 – Gruppe (8,3%), ein Tier aus der rt-PA – Gruppe (8,3%) und drei Tiere aus der Kombinationsgruppe (25%). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der periprozeduralen Mortalität zwischen den Gruppen ($p=0,392$, Kruskal-Wallis-Test).

Von den zehn Tieren, die in der ersten Nacht nach der Operation verstorben sind, war ein Tier aus der Placebogruppe (10%), ein Tier aus der Ultraschall, BR38 – Gruppe (10%), sechs Tiere aus der rt-PA – Gruppe (60%) und zwei Tiere aus der Kombinationsgruppe (20%). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Mortalität nach 24h zwischen den Gruppen ($p=0,392$, Kruskal-Wallis-Test).

24h nach Ischämieinduktion zeigten die Tiere deutliche klinische neurologische und motorische Einschränkungen.

Bei dem Neuroscore-Test ergaben sich bei der zweiten Messung nach der Operation folgende Werte: Placebogruppe $41,7 \pm 4,1$, Ultraschall, BR38 - Gruppe $32,5 \pm 2,9$, rt-PA - Gruppe $32,4 \pm 3,1$ und Kombinationsgruppe (rt-PA, BR38, Ultraschall) $36 \pm 3,2$. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p > 0,05$, geschätzte Randmittel) festgestellt werden.

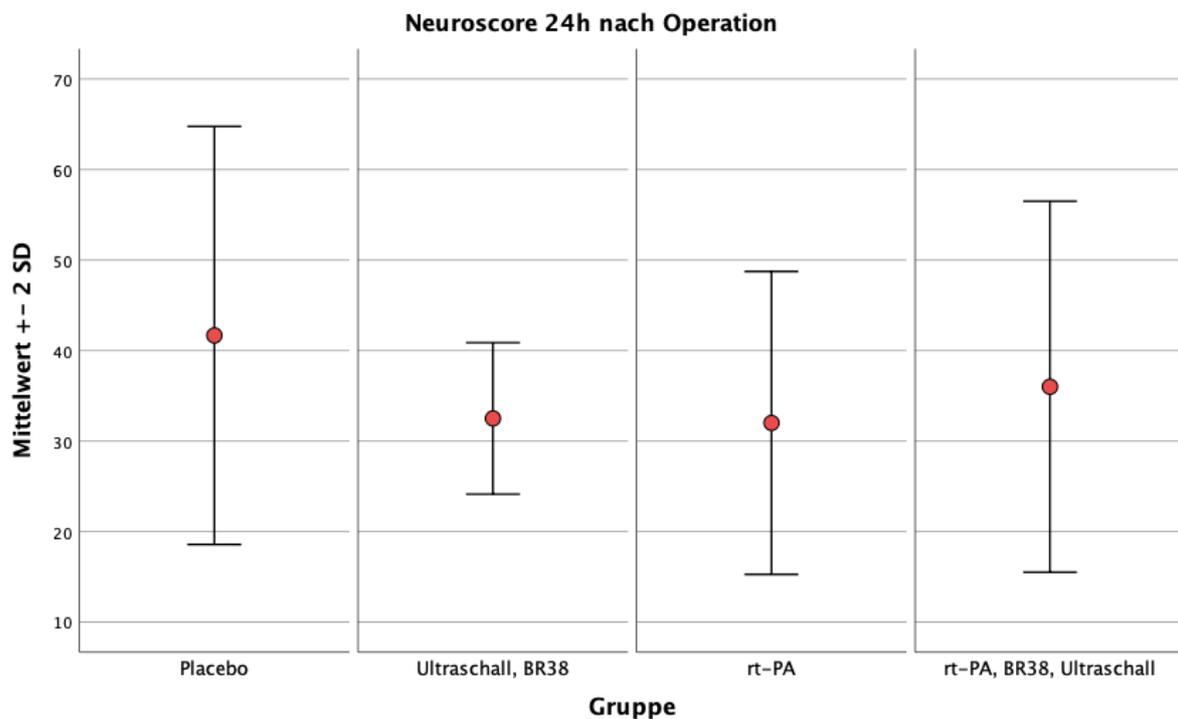


Abb.15: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen des Neuroscore-Test 24h nach der Operation. Höhere Werte zeigen eine stärkere klinische Beeinträchtigung an.

24h Stunden nach Induktion der Ischämie zeigte der Rotarod-Test folgende Werte: Placebogruppe $2,7 \text{ rpm} \pm 3,1 \text{ rpm}$, Ultraschall, BR38 - Gruppe $6 \text{ rpm} \pm 2,2 \text{ rpm}$, rt-PA - Gruppe $4,7 \text{ rpm} \pm 2,2 \text{ rpm}$ und Kombinationsgruppe $5,6 \text{ rpm} \pm 2,4 \text{ rpm}$. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant ($p > 0,05$, geschätzte Randmittel).

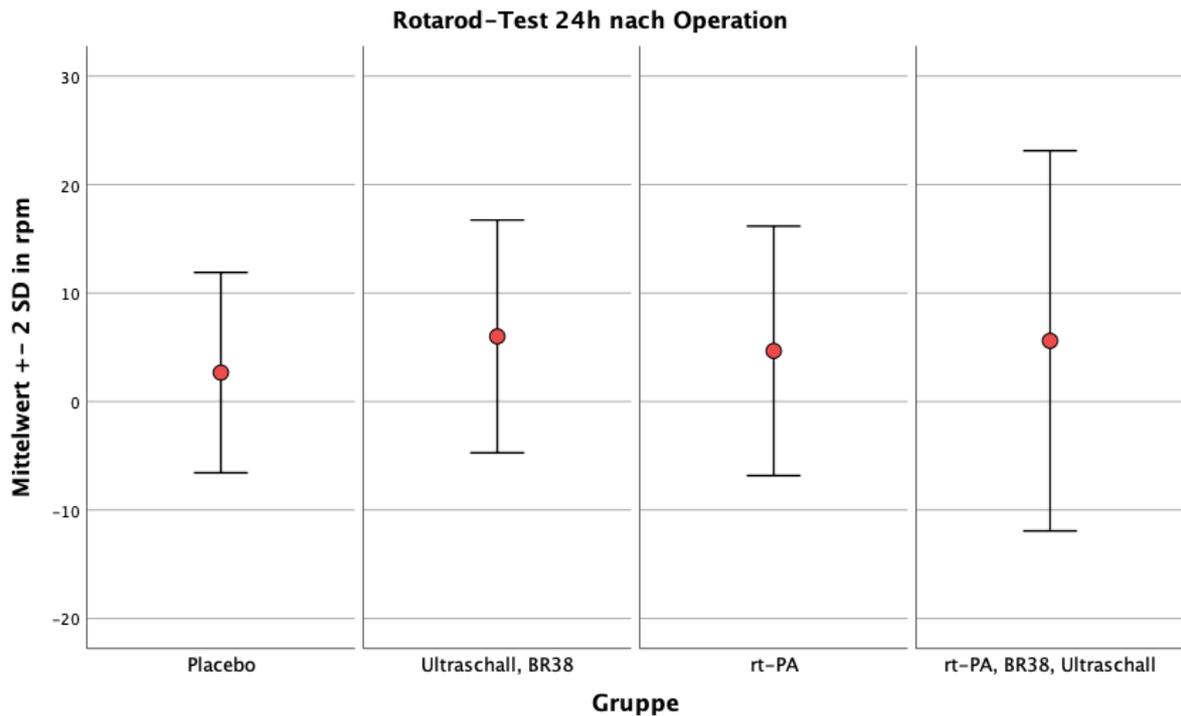


Abb.16: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen des Rotarod-Test 24h nach Operation. Niedrigere Werte zeigen eine stärkere klinische Beeinträchtigung an.

Infarktgrößen

Darstellung der Ergebnisse der T2Q-Messung

Die Gruppenvergleiche der ersten Messungen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p > 0,05$, geschätzte Randmittel). Die Mittelwerte lagen in der Placebo-Gruppe bei $0,08\text{cm}^3 \pm 0,1\text{cm}^3$. Die Ultraschall, BR38 – Gruppe hatte einen Mittelwert von $0,09\text{cm}^3 \pm 0,07\text{cm}^3$, die rt-PA - Gruppe $0,16\text{cm}^3 \pm 0,07\text{cm}^3$ und die Kombinationsgruppe (BR38, Ultraschall, rt-PA) $0,1\text{cm}^3 \pm 0,08\text{cm}^3$.

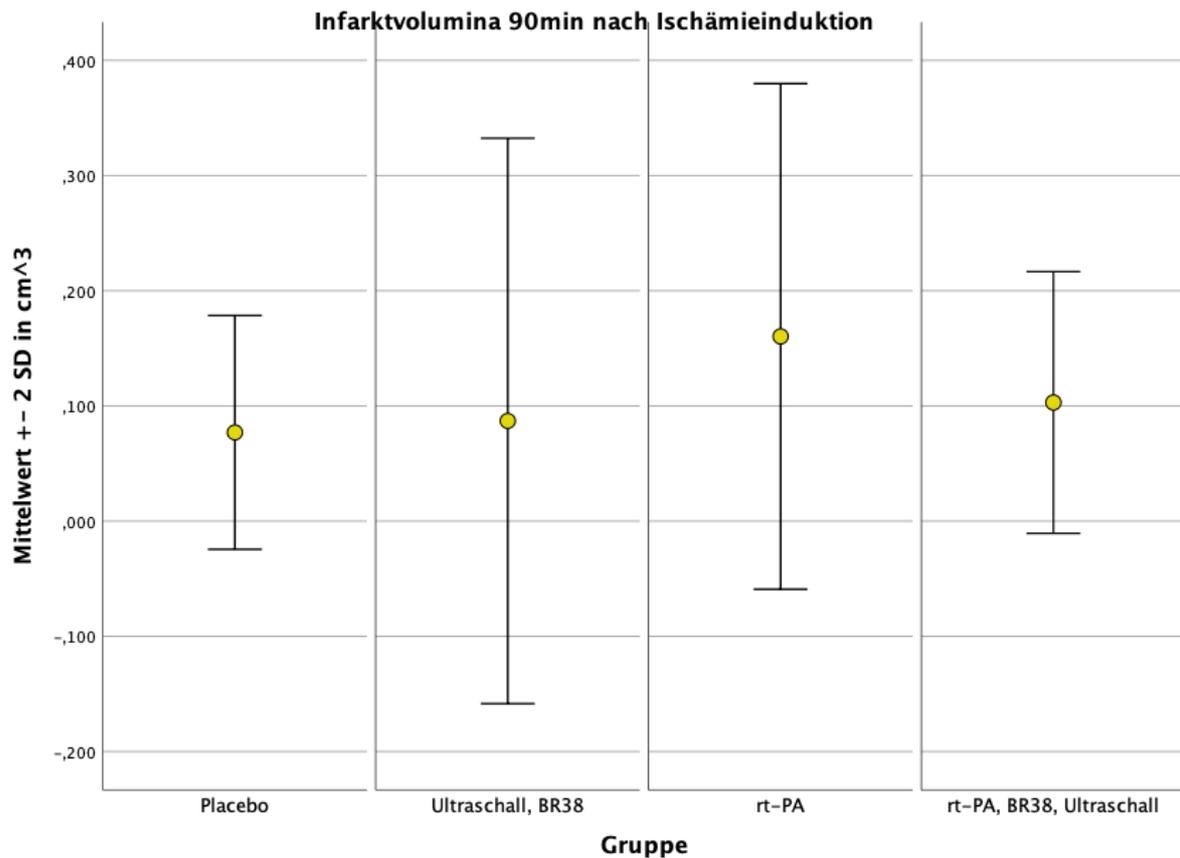


Abb.17: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen der Infarktgröße in cm^3 90 min nach der Operation. Ausgewertet wurde die MSME_T2Q Sequenz.

Bei der zweiten MRT-Messung zeigte die Placebo- Gruppe ($0,75 \text{ cm}^3 \pm 0,1 \text{ cm}^3$) einen signifikanten Unterschied zu allen anderen drei Gruppen ($p < 0,05$). Der Unterschied der Placebogruppe zur Ultraschall, BR38 - Gruppe ($0,43 \text{ cm}^3 \pm 0,07 \text{ cm}^3$) lag bei einer Signifikanz von 0,016 und zur rt-PA – Gruppe ($0,4 \text{ cm}^3 \pm 0,07 \text{ cm}^3$) lag sie bei 0,009. Der p-Wert bei dem Vergleich zwischen der Placebogruppe und der Kombinationsgruppe ($0,27 \text{ cm}^3 \pm 0,08 \text{ cm}^3$) betrug 0,001. Die Vergleiche der restlichen Gruppen untereinander, ausgenommen der Placebogruppe, ergaben keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, geschätzte Randmittel).

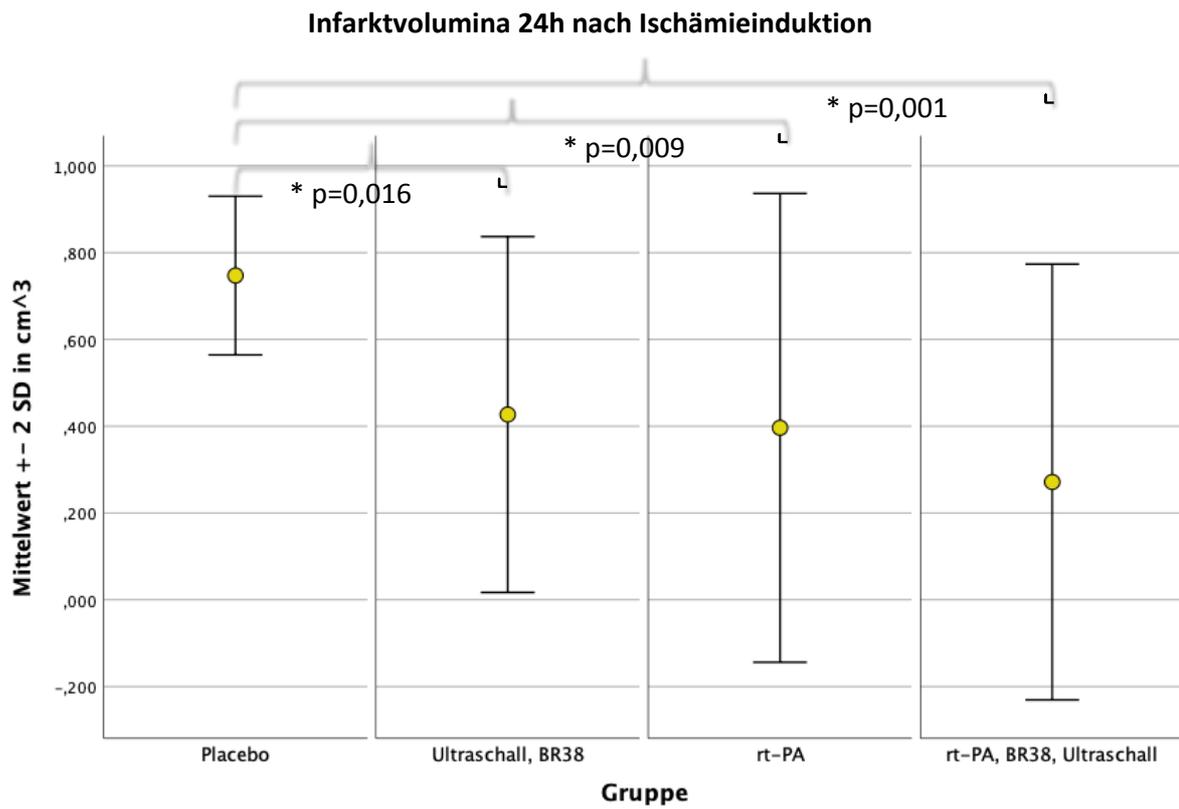


Abb.18: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen der Infarkt volumina in cm³ 24h nach Operation. Ausgewertet wurde die MSME_T2Q Sequenz.

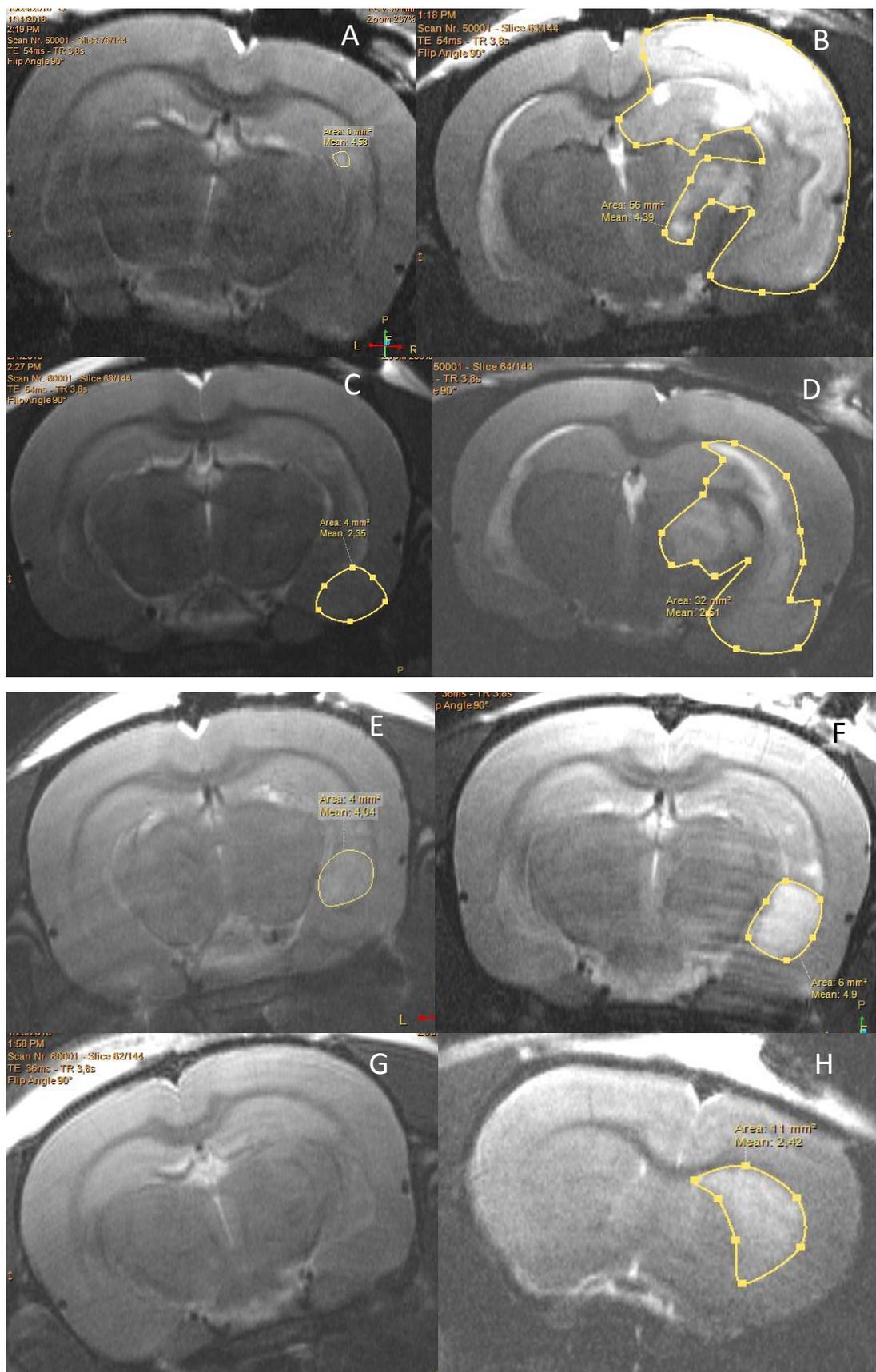


Abb.19: Unterschiede der Infarkt volumina in den einzelnen Behandlungsgruppen im Verlauf der ersten (90min) zu zweiter Messung (24h). Dargestellt in der MRI MSME_T2Q - Sequenz.
Placebogruppe: nach 90min (A), nach 24h (B)

Ultraschall, BR38 – Gruppe: nach 90min (C), nach 24h (D)

rt-PA – Gruppe: nach 90min (E), nach 24h (F)

Kombinationsgruppe: nach 90min (G), nach 24h (H)

Vergleich man die einzelnen Gruppen nicht untereinander, sondern die Zeitpunkte in jeder Behandlungsgruppe einzeln, so ließen sich auch hier signifikante Unterschiede statistisch darstellen. In der Placebogruppe und der Ultraschall, BR38 - Gruppe lag die Signifikanz der Vergleiche der zwei Messzeitpunkte bei $<0,001$ (geschätzte Randmittel). Die rt-PA - Gruppe hatte einen p-Wert von 0,007 und die Kombinationsgruppe von 0,062 (geschätzte Randmittel).

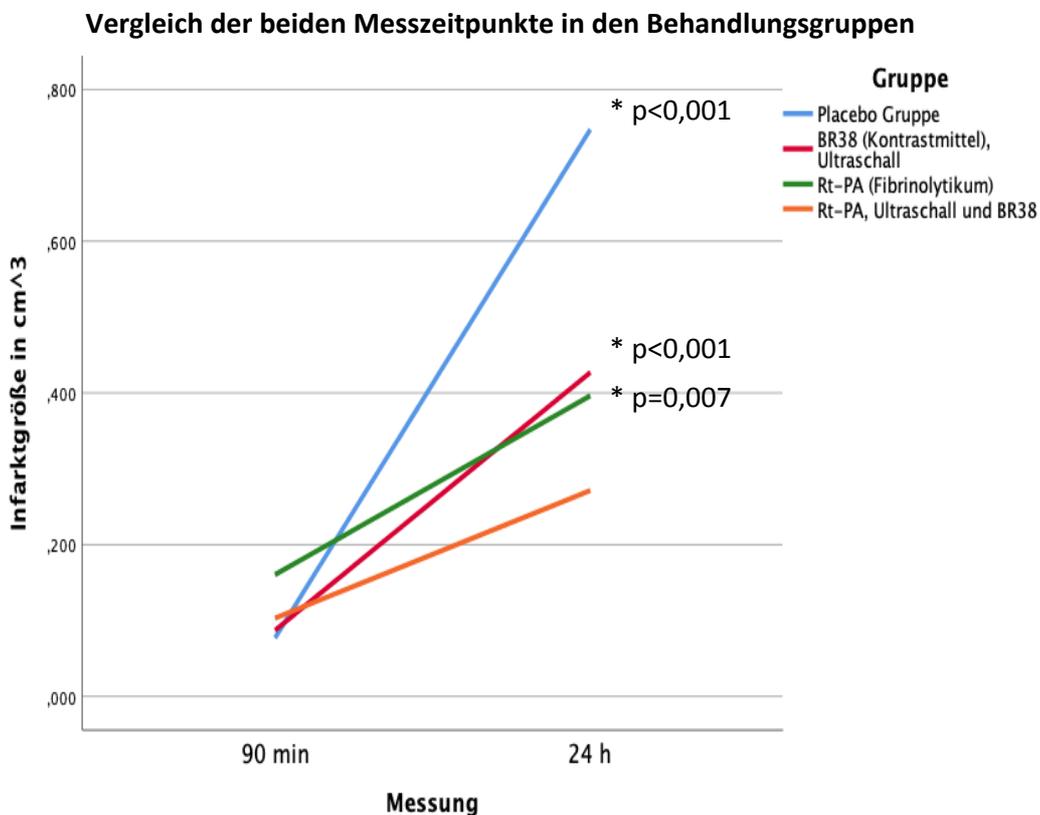


Abb.20: Darstellung der Mittelwerte der Infarktgrößen in cm^3 aufgeteilt in die Behandlungsgruppen

Unkorrigiertes Volumenverhältnis der Infarkte in der T2Q- Messung

Der Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander 90 Minuten nach der Operation ergab keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, geschätzte Randmittel). Folgende Werte ergaben

sich: Placebo Gruppe $6,86\% \pm 9,09\%$; Ultraschall, BR38 - Gruppe $7,61\% \pm 6,43\%$; rt-PA - Gruppe $14,61\% \pm 6,43\%$ und Kombinationsgruppe $9,45\% \pm 7,04\%$.

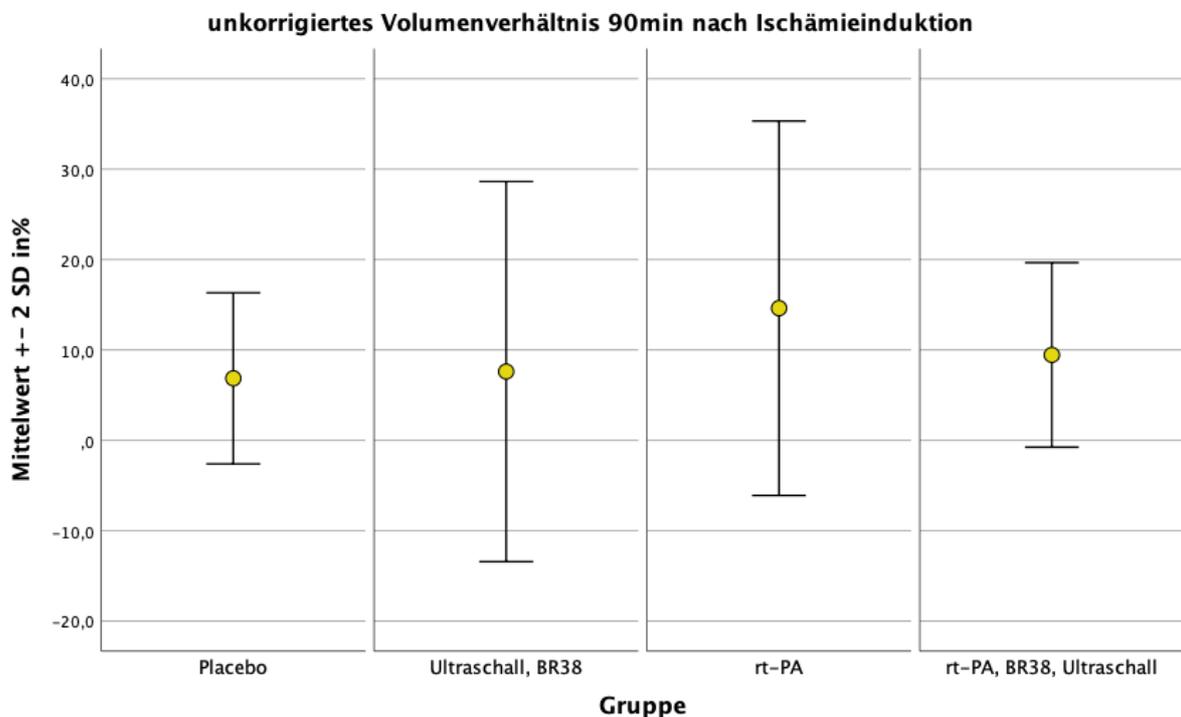


Abb.21: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen der unkorrigierten Volumenverhältnisse in % 90min nach der Operation.

Bei der zweiten Messung waren die Unterschiede der Placebogruppe ($67,78\% \pm 9,09\%$) zu allen anderen drei Behandlungsgruppen signifikant ($p < 0,05$, geschätzte Randmittel). Der Unterschied zwischen der Placebogruppe und der Ultraschall, Br38 - Gruppe ($37,76\% \pm 6,43\%$) zeigte eine Signifikanz von 0,012. Der p-Wert bei dem Vergleich zwischen der Placebogruppe und der rt-PA - Gruppe ($34,46\% \pm 6,43\%$) betrug 0,006. Die Kombinationsgruppe hatte das kleinste Volumenverhältnis ($23,95\% \pm 7,04\%$) und die Signifikanz zur Placebogruppe lag bei 0,001 (geschätzte Randmittel). Der Vergleich restlichen Behandlungsgruppe untereinander, ausgenommen der Placebogruppe, war nicht signifikant ($p > 0,05$, geschätzte Randmittel).

Unkorrigiertes Volumenverhältnis 24h nach Ischämieinduktion

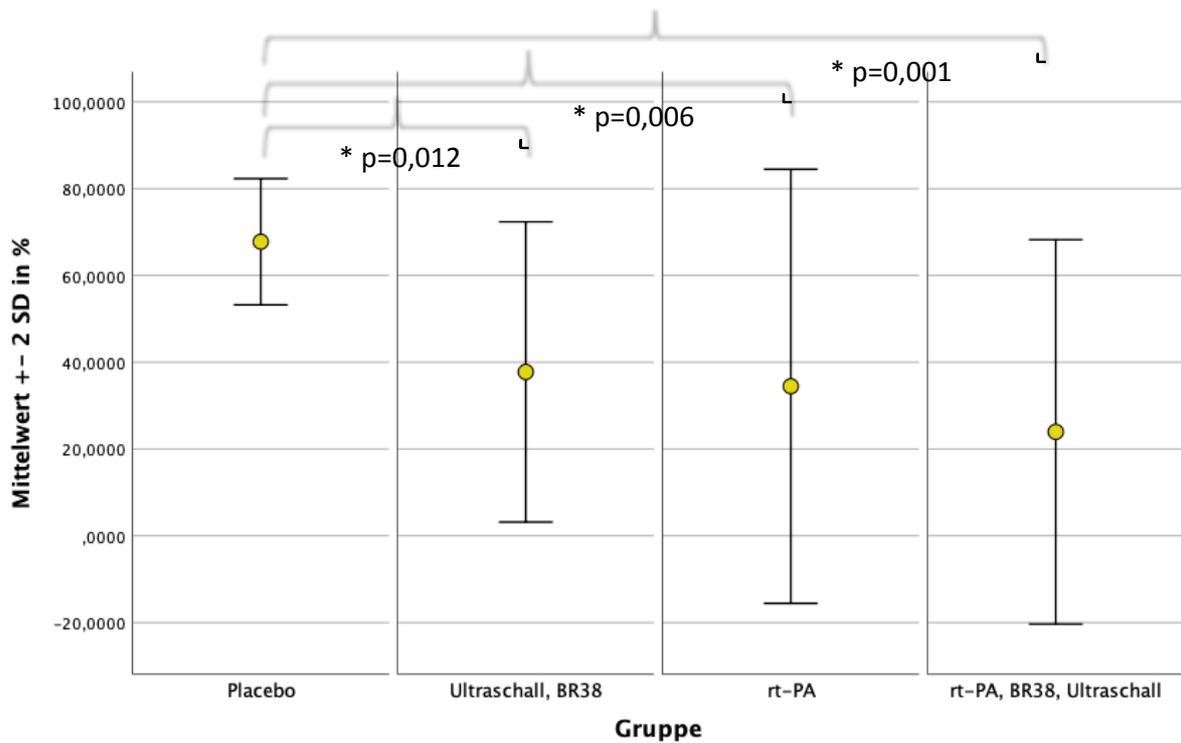


Abb.22: Darstellung Mittelwerte mit Standardabweichungen der unkorrigierten Volumenverhältnisse in % 24h nach Operation aufgeteilt in die Behandlungsgruppen.

Vergleich man die beiden Zeitpunkte der Messungen innerhalb jeder Behandlungsgruppe so ergaben sich in drei Gruppen signifikante Unterschiede. In der Placebogruppe und der Ultraschall, BR38 – Gruppe ergab sich eine Signifikanz von $p < 0,001$ (geschätzte Randmittel). In der rt-PA - Gruppe lag der p-Wert bei 0,01 (geschätzte Randmittel) und in der Kombinationsgruppe bei 0,07 (geschätzte Randmittel).

Vergleich der beiden Messzeitpunkte in den Behandlungsgruppen

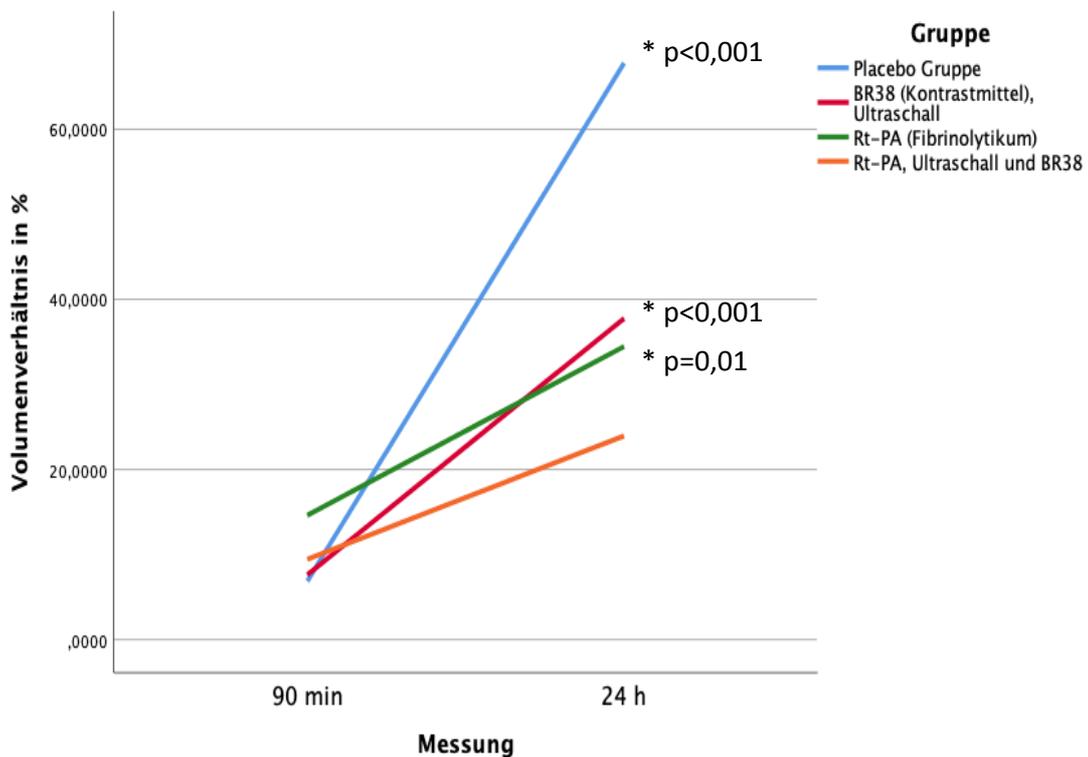


Abb.23: Darstellung der Mittelwerte des unkorrigiertes Volumenverhältnis in % aufgeteilt in die Behandlungsgruppen

Intrazerebrale Blutungen

Für die Ergebnisse der intrazerebralen Blutungen wurden die Daten aus den Auswertungen der SWI_Flash (MRT-Messung) und der Histologie Schnitte berücksichtigt. Das Vorhandensein einer Blutung wurde mit 1 notiert und das Nicht-Vorhandensein mit 0.

Ergebnisse der MRT-Messung

90 Minuten nach der Operation ergaben die Häufigkeiten der intrazerebralen Blutungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (p-Wert >0,05). Auch bei dem Vergleich der Häufigkeiten mit einem Chi-Quadrat-Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (p-Wert = 0,159). Placebogruppe, Ultraschall, Br38 – Gruppe und die Kombinationsgruppe hatten einen Mittelwert von 0 ± 0 und die rt-PA - Gruppe von $0,17 \pm 0,16$.

24h Stunden nach der Operation war der Unterschied zwischen der Placebogruppe (1 ± 0) und der rt-PA - Gruppe ($0,33 \pm 0,16$) signifikant (p-Wert= 0,02, geschätzte Randmittel), sowie zwischen der Placebogruppe und der Kombinationsgruppe ($0,4 \pm 0,17$) (p = 0,04, geschätzte Randmittel) signifikant. Der Rest der Gruppen zeigte untereinander keine signifikanten Unterschiede (p > 0,05, geschätzte Randmittel). Der Wert der Ultraschall, BR38 – Gruppe betrug $0,67 \pm 0,16$. Bei dem Vergleich der Häufigkeiten in den Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (p-Wert = 0,224, Chi-Quadrat-Test).

	90min	24h
Placebo Gruppe	0%	100%
Ultraschall, BR38 - Gruppe	0%	67%
rt-PA - Gruppe	33%	33%
Kombinationsgruppe	0%	40%

Tabelle 2: Anzahl der Tiere, die eine intrazerebrale Blutung aufweisen, in %.

Häufigkeit der intrazerebralen Blutungen in den Behandlungsgruppen inklusive der Tiere, die als Modellversager eingestuft wurden:

Bei der Durchführung des Chi-Quadrat-Tests ergab sich ein p-Wert von 0,097. Somit waren die Unterschiede zwischen den Häufigkeiten in den Gruppen nicht signifikant. Die Mittelwerte waren wie folgt: Placebogruppe, Ultraschall, BR38 – Gruppe und Kombinationsgruppe 0 ± 0 und rt-PA - Gruppe $0,2 \pm 0,42$.

Auch in den Messungen nach 24h Stunden ergaben sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede (p-Wert = 0,569, Chi-Quadrat-Test). Die Placebogruppe hatte folgenden Mittelwert von $0,21 \pm 0,43$, Ultraschall, BR38 - Gruppe $0,5 \pm 0,54$, rt-PA - Gruppe $0,3 \pm 0,483$ und die Kombinationsgruppe $0,38 \pm 0,52$.

	90min	24h
Placebo Gruppe	0%	21,43%
Ultraschall, BR38 - Gruppe	0%	50%
rt-PA - Gruppe	20%	30%
Kombinationsgruppe	0%	37,50%

Tabelle 3: Anzahl der Tiere, die eine intrazerebrale Blutung aufweisen in %.

Ergebnisse der histologischen Untersuchung

Die Auswertungen der histologischen Proben ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p > 0,05$, Chi-Quadrat Test). Jedes Tier wies mindestens eine Blutung auf.

	24h
Placebo Gruppe	100%
Ultraschall, BR38 - Gruppe	100%
rt-PA - Gruppe	100%
Kombinationsgruppe	100%

Tabelle 4: Anzahl der Tiere, die eine Mikroblutung im Gehirn aufweisen, in %

Diskussion:

Diese Arbeit hat sich mit der Sonothrombolyse als Therapie des ischämischen Schlaganfalles befasst. Das Hauptaugenmerk liegt vor allem auf der Wirkung der Sonothrombolyse zusammen mit rt-PA und dem Kontrastmittel Bracco 38. Untersucht wurden dazu die Größen der Schlaganfälle in Gehirnen von Ratten, die über einen Zeitraum von vierundzwanzig Stunden zweimal in einer MRT-Messung dargestellt wurden. Die Versuchstiere wurden in vier Behandlungsgruppen aufgeteilt und untereinander verglichen.

Neuroscore und Rotarod-Test

Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen auf. Über einen Zeitraum von 24h Stunden werden die Tiere zweimal neurologisch untersucht. Die Tiere zeigen bei der zweiten Testung deutliche neurologische und motorische Ausfälle, die typisch für einen Schlaganfall sind (siehe Abbildung 15 und 16). Zusätzlich dienen die beiden Tests der Überprüfung der eventuellen Belastung der Tiere und des Schweregrades des Versuches. Derartige Ergebnisse sind bei diesem kurzen Beobachtungszeitraum häufig. Ein längerer Beobachtungszeitraum, wie zum Beispiel bis zum siebten Tag nach der Operation, wäre aufgrund der Schwere des Versuches nicht vertretbar gewesen.

Hypothesen

1. Die Größe der Schlaganfälle nach der zweiten MRT - Messung ist in der Kombinationsgruppe mit der Therapie rt-PA, Ultraschall und BR38 am kleinsten.

Bei der ersten MRT - Messung 90 Minuten nach der Ischämie Induktion zeigen die Tiere keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen (siehe Abbildung 17). Die prozentuale Volumenverhältnisse zeigen bei der ersten Messung vergleichbare Ergebnisse (siehe Abbildung 21). Die erste Messung dient insbesondere dem Nachweis der Funktionalität des Modells bzw. um Modellversager frühzeitig ausschließen zu können. Die fehlenden Unterschiede sind daher nicht überraschend. Ischämische Läsionen zeigen sich erst nach einiger Zeit in der T2-Bildgebung, da sich das zerebrale vasogene Ödem erst entwickeln muss. Ungeschädigtes Hirngewebe kann noch vorhanden sein und wird durch Kollaterale versorgt. Es ist möglich, dass dieses System erst im Laufe der Zeit zusammenbricht und daher ein verzögertes Infarktwachstum bedingt wird. Durch das vasogene Ödem kommt es zu

einer kompressiven Wirkung auf die Hirngefäße und damit mit der Zeit zu einem sekundären Infarktwachstum. Dieses Ödem ist für bis zu 50% des definitiven Infarktvolumens verantwortlich (Walberer, Ritschel et al. 2008).

24h Stunden nach der Ischämieinduktion zeigt die Placebogruppe die größten Infarktvolumina (siehe Abbildung 18). Diese Gruppe unterscheidet sich signifikant von allen anderen Behandlungsgruppen. Die prozentualen Volumenverhältnisse zeigen das gleiche Ergebnis (siehe Abbildung 22). Die Placebogruppe unterscheidet sich signifikant von allen Behandlungsgruppen, aber die Behandlungsgruppen untereinander unterscheiden sich statistisch nicht. In der Kombinationsgruppe ist das Infarktvolumen zwar am geringsten, der Unterschied zu den anderen Gruppen jedoch nicht signifikant.

In der Kombinationsgruppe kommt es 24h nach Ischämieinduktion zu einer additiven Wirkung der Therapiemöglichkeiten. Die Wirkung des rt-PA wird auf den Verschluss des Gefäßes verstärkt, da durch die Zerstörung des Fibringeflechts durch das Kontrastmittel BR38 rt-PA besser und tiefer in den Thrombus eindringen kann. Es sind mehr Angriffsflächen vorhanden, da die Oberfläche vergrößert wird und der Thrombus daher vermutlich schneller und vollständiger aufgebrochen werden kann.

Bemerkenswerterweise ist in dieser Studie zu sehen, dass die Behandlungskombination von Sonothrombolyse plus Mikrobläschen in etwa die gleichen Ergebnisse erzielt wie die Monotherapie mit rt-PA, sowie die Therapie mit rt-PA und Sonothrombolyse plus Mikrobläschen. Es wäre daher zu überlegen, ob Ultraschall in Kombination mit BR38 eine mögliche Therapie bei Kontraindikationen gegen rt-PA darstellen könnte. Da aber rt-PA bereits seit langem als Standardtherapie in die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft der Neurologie integriert ist, wäre eine weitere Untersuchung ohne Gabe von rt-PA beim Menschen ethisch nicht vertretbar.

2. Zunahme der Infarktgröße ist in der Kombinationsgruppe von erster MRT-Messung zu zweiter MRT-Messung am kleinsten.

Wenn man die Behandlungsgruppen nicht untereinander vergleicht, sondern den Zuwachs der Infarkte innerhalb der Gruppe von Messung 1 (90min) zu Messung 2 (24h), ist deutlich zu erkennen, dass die Kombinationsgruppe den kleinsten Zuwachs hat (siehe Abbildung 20). Die Vergleiche der prozentualen Volumenverhältnisse der vier Gruppen ergeben die gleiche Verteilung (siehe Abbildung 23).

Die größte Zunahme in der Placebogruppe spricht für eine große Ödembildung nach Induktion des ischämischen Infarkts, sowie für eine schlechte Penumbra durchblutung ohne Regeneration.

In den drei Gruppen, die eine Therapie bekommen haben, ist der Unterschied zwischen den beiden Messungen deutlich geringer und nicht signifikant. Daher lassen sich in dem Zusammenhang sekundär neuroprotektive Effekte vermuten. Die endogene Neuroprotektion bezieht sich auf die Fähigkeit des Gehirns, auf äußere Schäden zu reagieren, wobei die Wirksamkeit von der Intensität und der Art des Reizes abhängt. Das Ziel der Konditionierung ist es, endogene Schutzmechanismen durch alternierende transiente Ischämie oder Reperfusion (IR) vor, während oder nach einer Ischämie auszulösen. Die ischämische Postkonditionierung induziert eine in situ ischämische Postkonditionierung (ISP) sowie eine ferngesteuerte ischämische Postkonditionierung (RIP). Die zerebrale ISP bezieht sich auf die Unterbrechung des Blutflusses in den frühen Stadien der zerebralen Ischämie und regt das Hirngewebe an, endogene neuroprotektive Mechanismen in Gang zu setzen und die Reperfusionsschäden zu verringern (Ma, Li et al. 2022). Zu den neuroprotektiven Mechanismen gehören laut einer Studie an Ratten die Verbesserung des zerebralen Blutflusses, die Verhinderung der Cytochrom-c-Translokation und die Aktivierung der Proteinkinase-B- (Akt) und Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3K) Signalwege (Li, Li et al. 2017, Tyagi, Singh et al. 2019). Es wurden mehrere Mechanismen identifiziert, die den durch ischämische Konditionierung induzierten neuroprotektiven Effekten zugrunde liegen, darunter die Regulierung der neurotrophen Proteinexpression, die Verbesserung der neurovaskulären Netzwerke, die Abschwächung der Entzündungsreaktion und der neuronalen Apoptose sowie die Förderung von Stoffwechselreaktionen im Gehirn. Die endogenen neuroprotektiven Wirkungen der ischämischen Nachbehandlung (RIP und ISP) und die Signalwege, die diese Wirkungen vermitteln, sind jedoch noch nicht vollständig erforscht (Ma, Li et al. 2022).

In den meisten Studien wird die Sonothrombolyse in Kombination mit Mikrobläschen als effizient eingestuft. Es wurden jedoch zahlreiche unterschiedliche primäre Endpunkte verwendet, wie z. B. das Läsionsvolumen, das Vorhandensein einer Rekanalisation, D-Dimer-Werte und klinische Scores. Zu den weiteren methodischen Unterschieden gehören das Tiermodell (Schwein, Ratte, Kaninchen), die Gerinnselpräparation (autologes, menschliches Gerinnsel, rotes oder weißes Gerinnsel), die Art der Mikroblasenverabreichung (arteriell oder venös), die Ultraschall-Parameter und die Verwendung von rt-PA (Auboire,

Sennoga et al. 2018). Diese Heterogenität erschwert die Einordnung unserer Ergebnisse. Nur acht Studien untersuchten Sonothrombolyse plus Mikrobläschen bei Ratten (Alonso, Dempfle et al. 2009, Moumouh, Barentin et al. 2010, Nedelmann 2010, Ren, Wang et al. 2015, Tomkins, Schleicher et al. 2015, Lu, Wang et al. 2016, Schleicher, Tomkins et al. 2016, Dixon, Li et al. 2019). In sechs dieser Studien wurde Sonothrombolyse plus Mikrobläschen mit rt-PA kombiniert (Nedelmann 2010, Ren, Wang et al. 2015, Tomkins, Schleicher et al. 2015, Lu, Wang et al. 2016, Schleicher, Tomkins et al. 2016, Dixon, Li et al. 2019).

Nedelmann et al. und Schleicher et al. verwendeten ein Fadenmodell zur Beurteilung mikrovaskulärer Beeinträchtigungen. Nedelmann et al. wiesen eine geringere vaskuläre Beeinträchtigung der ipsilateralen Hemisphäre nach 60 Minuten bestehendem MCAO nach, wenn Sonothrombolyse plus Mikrobläschen in Kombination mit rt-PA verwendet wurde, verglichen mit Placebo, rt-PA allein, Sonothrombolyse mit Mikrobläschen allein oder der Kombination von rt-PA und Sonothrombolyse ohne Mikrobläschen. Sie zeigten auch ein geringeres Infarktvolumen und weniger Hirnödeme, aber keine Unterschiede im klinischen Ergebnis bei Sonothrombolyse plus Mikrobläschen in Kombination mit rt-PA im Vergleich zu rt-PA allein (Nedelmann, Ritschel et al. 2010). Schleicher et al. untersuchten rt-PA mit Sonothrombolyse plus Mikrobläschen mit zwei verschiedenen Mikroblasentypen (Sonovue® und BR38®) und unterschiedlichen Mikroblasendosierungen (volle Dosis vs. 1/3 Dosis). Sie konnten bei allen mit Sonothrombolyse plus Mikrobläschen behandelten Tieren eine geringere Beeinträchtigung der Gefäße in der ipsilateralen Hemisphäre nachweisen als bei den Kontrollen oder bei rt-PA allein. Außerdem untersuchten sie histologisch das Volumen der ischämischen Läsion bei den Kontrollen, nur bei rt-PA und bei der Kombination von rt-PA und Sonothrombolyse plus Mikrobläschen (BR38®; volle Dosierung). Bei der Kombination beider Therapien war das Ischämievolumen im Vergleich zu den Kontrollen geringer (Schleicher, Tomkins et al. 2016). Ren et al. und Lu et al. verwendeten fragmentierte Thromben, um eine Ischämie auszulösen. Bei Verwendung eines Vollblutthrombus und Sonovue® konnten Ren et al. eine schnellere Rekanalisation zeigen, wenn Sonothrombolyse plus Mikrobläschen mit rt-PA nach 10 Minuten Behandlung kombiniert wurde. Bei rt-PA und einer Kombination aus Sonothrombolyse plus Mikrobläschen und rt-PA in halbiertes Dosierung wurden diese Ergebnisse jedoch erst nach 20 Minuten Behandlung erzielt.

Zwanzig Minuten nach Einleitung der Ischämie führte Sonothrombolyse plus Mikrobläschen allein nicht zu einer Rekanalisation (Ren, Wang et al. 2015). Lu et al. verwendeten weiße und rote Thromben in Kombination mit einem Placebo, Sonothrombolyse ohne Mikrobläschen,

Sonothrombolyse plus Mikrobäschen allein, rt-PA allein oder rt-PA kombiniert mit Sonothrombolyse plus Mikrobäschen. Als Mikrobäschen-Präparat wurden Perfluorpropan-Mikrobäschen mit Lipidhülle verwendet. Sonothrombolyse plus Mikrobäschen verringerte das Infarktolumen und zeigte unabhängig von den verwendeten Thromben ein besseres klinisches Ergebnis. Sonothrombolyse plus Mikrobäschen führte zu einem geringeren Infarktolumen bei Verwendung roter Thromben im Vergleich zu rt-PA, während das klinische Ergebnis bei Sonothrombolyse plus Mikrobäschen und weißen Thromben im Vergleich zu rt-PA besser war. Die Kombination von rt-PA mit Sonothrombolyse plus Mikrobäschen führte bei roten Thromben zu einem geringeren Infarktolumen als bei rt-PA allein. Dieser Effekt wurde bei Verwendung weißer Thromben nicht beobachtet (Lu, Wang et al. 2016).

Tomkins et al. verwendeten einen durchgehenden 3 cm langen weißen Thrombus, um eine MCAO zu erreichen, und BR38 als Mikrobäschentyp. Der weiße Thrombus erwies sich in diesem Modell als resistent gegen die Wirkung von Sonothrombolyse plus Mikrobäschen in Kombination mit rt-PA (Tomkins, Schleicher et al. 2015).

Dixon et al. verwendeten ein mikrofluidisches Gerät zur Herstellung von Mikrobäschen. Die MCAO wurde durch einen kontinuierlichen Vollblutthrombus erreicht. Die Mikrobäschen wurden direkt in die ACI verabreicht. Sie verglichen Sonothrombolyse plus Mikrobäschen mit niedrig dosiertem rt-PA, mit niedrig dosiertem rt-PA allein, hoch dosiertem rt-PA allein und Kontrollen. Bei den mit hochdosiertem rt-PA behandelten Tieren war das Ischämievolumen geringer und das klinische Ergebnis besser als bei den Kontrolltieren. Bei Sonothrombolyse plus Mikrobäschen mit rt-PA war keine Verringerung des Infarktolumens im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten, jedoch war das klinische Ergebnis 24 Stunden nach der Behandlung besser (Dixon, Li et al. 2019).

Unsere Studie zeigt die Wirksamkeit und Sicherheit von Sonothrombolyse plus Mikrobäschen mit oder ohne rt-PA in einem embolischen Schlaganfallmodell bei Ratten mit einem kontinuierlichen Vollblutthrombus. Es ist schwierig, unsere Ergebnisse mit denen von Dixon et al. zu vergleichen. Sie berichteten über ein Gerinnselvolumen von 16 µl, das über einen PE-10-Katheter verabreicht wurde. Der Durchmesser des PE-10-Katheters wurde nicht angegeben und variiert von Hersteller zu Hersteller (Dixon, Li et al. 2019). Bei der Berechnung der Länge unter Verwendung eines Innendurchmessers von 0,28 mm und wenn das gesamte Volumen aus Thrombusmaterial bestünde, würde dies zu einem ~26 cm langen Thrombus führen, der der Ratte verabreicht wurde. In unsere Studie ist der Thrombus

allerdings nur vier Zentimeter lang. Wir können damit eine Wirkung von Sonothrombolyse plus Mikrobläschen ohne Verwendung von rt-PA nachweisen.

Lu et al. und Ren et al. wiesen eine Wirkung von Sonothrombolyse plus Mikrobläschen ohne rt-PA bei Ratten nach, verwendeten aber ein anderes Gerinnungsmodell (Ren, Wang et al. 2015, Lu, Wang et al. 2016). Brown et al. konnten ebenfalls eine Wirkung von Sonothrombolyse plus Mikrobläschen allein nachweisen, allerdings bei Kaninchen (Brown, Flores et al. 2011). In vitro-Studien haben gezeigt, dass moderate Ultraschall-Intensitäten eine begrenzte Wirkung auf die Thrombolyse ohne rt-PA haben (Bader, Gruber et al. 2015). Allerdings ist in der in-vivo-Situation jedoch intrinsisches t-PA vorhanden, das eine thrombolytische Wirkung erleichtern könnte.

3. Die Anwendung der Sonothrombolyse ist sicher.

Die intrazerebralen Blutungen werden 90 Minuten und 24 Stunden nach der Ischämie Induktion in der suszeptibilitätsgewichteten Bildgebung (Saver, Goyal et al. 2015) beobachtet und ausgezählt. Sowohl in der Auswertung 90 Minuten nach Operation, als auch in der Auswertung 24 Stunden nach Operation zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. In der Auswertung der 24 Stunden Messung sind in jeder Behandlungsgruppe Blutungen zu finden (siehe Tabelle 2). Die Verteilung der prozentualen Volumenverhältnisse ist identisch mit den absoluten Infarktgrößen (siehe Tabelle 3).

Der Unterschied zwischen der ersten und zweiten Messung lässt sich mit dem längeren Zeitraum der zweiten Messung nach der Induktion der Ischämie erklären. Intrazerebrale Blutungen müssen eine bestimmte Größe erreichen, bis sie im MRT sichtbar werden.

Die histologischen Auswertungen zeigen, dass jedes einzelne Tier mindestens eine Mikroblutung oder größere Blutungen aufweist (siehe Tabelle 4). Histologisch lassen sich auch sehr kleine Blutungen nachweisen, die in der MRT-Bildgebung nicht nachweisbar sind. Beim Menschen gibt es wenig Literatur zu den Auswirkungen von Mikroblutungen. Es wird vermutet, dass sie intrazerebrale Blutungen begünstigen (Charidimou, Shoamanesh et al. 2016). Die Tiere in dieser Studie unterscheiden sich funktionell nicht voneinander.

In älteren Studien wurde die Sicherheit der Sonothrombolyse im Zusammenhang mit Ultraschalleffekten diskutiert (Daffertshofer, Gass et al. 2005, Masomi-Bornwasser, Winter et al. 2017). Da aber bei den Tieren in den Behandlungsgruppen mit Sonothrombolyse die intrazerebralen Blutungen nicht signifikant vermehrt auftreten, kann nicht von einer erhöhten

Blutungsneigung im Zusammenhang mit der Behandlung gesprochen werden. Die Sonothrombolyse mit oder ohne rt-PA scheint daher eine sichere Methode zu sein.

Auch bereits in Phase-III-Studien (Schellinger, Alexandrov et al. 2015) wurde gezeigt, dass die Sonothrombolyse ausreichend sicher ist.

Limitationen

Diese Studie weist einige Limitationen auf. Die Induktion der Ischämie ist mit Komplikationen und periprozeduraler Mortalität verbunden. Das Thrombemboliemodell ist ein kompliziertes und aufwändiges Modell und daher fehleranfällig. Die Arteria carotis interna wird blind mit einem Vollblutthrombus verschlossen. Da es nicht beeinflussbar ist, an welcher Stelle der Thrombus das Gefäß verschließt und die Blutzufuhr somit unterbricht, kann es bei verschiedenen Tieren zu unterschiedlichen Verschlüssen kommen. Das hat die Folge, dass die Größe und die Lage der Infarkte unterschiedlich sind. Daher mussten einige Tiere ausgeschlossen werden, die nicht über einen Arteria Media Infarkt verfügen. Auch bei den eingeschlossenen Tieren unterscheiden sich die Infarkte immer noch in ihrer Größe.

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Infarkte sind vermutlich die Eigenschaften des Thrombus. Der Thrombus wird wie oben in den Methoden beschrieben aus dem Eigenblut der Ratte gewonnen. So ist der Thrombus zwar gut für die jeweilige Ratte verträglich, jedoch können die gewünschten übereinstimmenden Eigenschaften bei allen Tieren nicht vorausgesetzt werden. Daher besteht der Thrombus jedes Mal aus einer anderen Zusammensetzung, auch war die Dicke und Gleichmäßigkeit nicht immer vergleichbar.

Im Verlauf der Studie sind ein Drittel der Tiere verstorben (siehe Tabelle 1). Die Belastung der Tiere ist somit nicht zu vernachlässigen. Das ist auch ein Grund dafür, warum die Varianz in den Auswertungen sehr groß ist. Leider lässt sich nicht bestimmen, ob die Tiere an der Schwere der Operation oder an der anschließenden Therapie verstorben sind.

Zusätzlich litten die Tiere einen Tag nach der Operation zur Induktion des Schlaganfalles noch unter den Folgen des Eingriffes und eine Einschätzung der motorischen und neurologischen Ausfälle ist somit schwierig. Auch wurde bereits in älteren Studien (Nedelmann, Wilhelm-Schwenkmezger et al. 2007) angemerkt, dass ein Beobachtungszeitraum über 24h Stunden zu kurz ist, um Verbesserungen der Motorik und neurologischen Ausfälle sichtbar zu machen. Sicherlich wäre es für diese beiden Tests von Vorteil gewesen, die Tiere zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. nach 7 Tagen) erneut zu untersuchen, um eventuelle Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen aufzeigen zu können.

Ein weiterer Nachteil der zu kurzen Nachbeobachtungszeit ist, dass somit eine Aussage über mögliche Langzeitschäden nicht gegeben werden kann, sowie die Benutzung von jungen und gesunden, männlichen Tieren. Die Übertragbarkeit der Studie auf den Menschen ist damit reduziert, da bei Menschen zumeist ältere Patienten mit Begleiterkrankungen am Schlaganfall erkranken (Fluri, Schuhmann et al. 2015).

Ausblick

Unser Experiment unterstreicht die Wirksamkeit und Sicherheit von Sonothrombolyse plus Mikrobläschen in experimentellen in vivo Schlaganfallmodellen. Eine Meta-Analyse der Schlaganfallstudien am Menschen ergab jedoch, dass die Sonothrombolyse mit oder ohne Verwendung von Mikrobläschen keine positiven Auswirkungen zeigt (Molina, Ribo et al. 2006, Molina, Barreto et al. 2009, Nacu, Kvistad et al. 2017). In den Studien wurden verschiedene Kontrastmittel wie Levovist®, Sonovue® oder Mikrosphären verwendet. In der größten Studie, der CLOTBUST-ER-Studie, wurde kein kontrastverstärkendes Mittel verwendet (Alexandrov, Köhrmann et al. 2019). Die Anwendung von Sonothrombolyse plus Mikrobläschen wurde teilweise durch die Art der Verabreichung der Mikrobläschen eingeschränkt, da diese entweder kontinuierlich oder mit mehreren Boli im Verlauf der Therapie verabreicht werden mussten. Die Relevanz der Sonothrombolyse im klinischen Umfeld blieb fraglich, zumal die Studien zur endovaskulären Therapie (MR-CLEAN28, ESCAPE29, EXTEND-IA30, SWIFT-PRIME31, REVASCAT32) deren große Behandlungseffekte belegten. Wie Alexandrov et al. feststellten, werden neue Studien, in denen neue nicht endovaskuläre Ansätze getestet werden, in Zukunft nur schwer zu realisieren sein, und es ist fraglich, ob neue Studien zur Sonothrombolyse entstehen werden (Alexandrov, Tsivgoulis et al. 2019). Die jüngste Studie, die TRUST-Studie, bei der eine benutzerunabhängige Kopfhaltung für die Insonation verwendet wurde, rekrutiert seit 2018 nicht mehr (Quelle: clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03519737), und es wurden noch keine Ergebnisse veröffentlicht. Es bleibt fraglich, ob die Sonothrombolyse bei zerebralen Großgefäßverschlüssen eine Rolle spielt, da diese Patienten auch eine endovaskuläre Therapie erhalten könnten. Ein Szenario, in dem ein Patient für diese Therapie nicht in Frage kommt, scheint nicht realistisch zu sein. Allerdings könnte die Sonothrombolyse während des Transports von einem primären Schlaganfallzentrum in ein Krankenhaus zur endovaskulären Therapie eingesetzt werden. Diese Situation wurde in der TRUST-Studie untersucht. Auch Patienten mit einem weiter distal gelegenen Gefäßverschluss könnten von der Wirkung der Sonothrombolyse profitieren. Dennoch könnte die Sonothrombolyse das Schicksal der

Neuroprotektion teilen, da sie zwar in Tiermodellen wirksam ist, aber keine Auswirkungen auf das funktionelle Ergebnis von Schlaganfallpatienten zeigt. Daher wird die Sonothrombolyse in der klinischen Routine weiterhin keine Rolle spielen.

Zusammenfassung:

Diese Studie beschäftigte sich mit dem ischämischen Schlaganfall. Dieser stellt die zweithäufigste Todesursache weltweit und den häufigsten Grund für bleibende Behinderung im Erwachsenenalter dar. Für eine erfolgreiche Therapie ist eine schnelle und sichere Rekanalisation des verschlossenen Gefäßes notwendig.

Das Ziel dieses Forschungsvorhabens war es, die kontrastmittelverstärkte Sonothrombolyse im Tiermodell an der Ratte unter definierten und bereits in Vorstudien wirksamen Ultraschallparametern zu untersuchen und diese Therapie mit einer rt-PA-Gabe zu kombinieren.

Den männlichen Wistar-Unilever Ratten wurde mit einem vorher hergestellten Vollblutthrombus mit der Methode des Thrombembolielmodells die Arteria Cerebri Media verschlossen und für 40min Minuten belassen. Danach erfolgte eine einstündige Therapiephase. Die Tiere wurden in vier Behandlungsgruppen randomisiert. Die erste Gruppe erhielt Placebopräparate (NaCl). Die zweite Gruppe hat Ultraschall und BR38 bekommen. Die dritte Gruppe hat nur rt-PA erhalten und die vierte Gruppe hat Ultraschall, BR38 und rt-PA bekommen. Der therapeutische Effekt wurde anhand der Auswertungen der Infarktgröße und die Sicherheit anhand der Mortalität ermittelt.

24h Stunden nach der Operation zeigte die Gruppe mit Ultraschall, BR38 und rt-PA – Behandlung die kleinsten Infarkte. Die zweite Gruppe mit Ultraschall und BR38 – Behandlung, sowie die reine rt-PA Behandlungsgruppe hatten etwas größere Infarkte und lagen etwa im Vergleich zueinander im selben Bereich. Die deutlich größten Infarkte hatte die Placebogruppe.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kombinationsgruppe mit allen drei Behandlungsmöglichkeiten den größten Therapierfolg darstellt. Da die Eigenschaften des Thrombus im klinischen Alltag aber nicht bekannt sind, kann aus diesem Grund eine Anwendung momentan nicht empfohlen werden. Weitere Studien zu diesem Thema sollten sich anschließen. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse einen etwa gleichen Effekt zwischen der rt-PA, sowie der Ultraschall und BR38 – Gruppe. Möglicherweise kann je nach Thrombusbeschaffenheit eine alleinige Ultraschalltherapie wirksam sein im Vergleich zur rt-PA-Therapie, die jedoch mit Nebenwirkungen belastet ist. Da es sich bei der systemischen Thrombolyse jedoch um eine bereits etablierte Therapie handelt, erscheint es ethisch nicht vertretbar, dass die beiden Therapiemethoden gegeneinander getestet werden können. Auch war die Ausfallrate in dieser Studie sehr hoch und die Sicherheit der Therapie somit fraglich.

Summary:

This study focused on ischemic stroke. It is the second leading cause of death worldwide and the most common cause of permanent disability in adulthood. Successful therapy requires rapid and safe recanalization of the occluded vessel.

The aim of this research project was to investigate contrast-enhanced sonothrombolysis in an animal model in the rat under defined ultrasound parameters already effective in preliminary studies and to combine this therapy with rt-PA administration.

The male Wistar-Unilever rats were occluded with a previously prepared whole blood thrombus using the thromboembolism model method and then left for 40min minutes. This was followed by a one-hour treatment period. Animals were randomized into four treatment groups. The first group received placebo (NaCl). The second group received ultrasound and BR38. The third group received rt-PA only, and the fourth group received ultrasound, BR38, and rt-PA. Therapeutic effect was determined by infarct size evaluations and safety by mortality.

At 24 h after surgery, the group with ultrasound, BR38, and rt-PA treatment showed the smallest infarcts. The second group with ultrasound and BR38 - treatment, as well as the rt-PA treatment-only group, had slightly larger infarcts and were approximately in the same range when compared with each other. The placebo group had the significantly largest infarcts.

The results show that the combination group with all three treatment options represented the greatest therapeutic success. However, since the characteristics of the thrombus in clinical practice are not known, its use cannot be recommended at this time. Further studies on this topic should follow. In addition, the results show an approximately equal effect between the rt-PA, and the ultrasound and BR38 groups. It is possible that, depending on the nature of the thrombus, ultrasound therapy alone may be effective compared with rt-PA therapy, but it is fraught with side effects. However, because systemic thrombolysis is an already established therapy, it does not seem ethically justifiable that the two therapeutic methods can be tested against each other. Also, the failure rate in this study was very high and the safety of the therapy is therefore questionable.

Literaturverzeichnis:

Aaron, S., S. Mani, A. T. Prabhakar, P. S. Babu, S. Kumar, R. N. Benjamin, A. Sivadasan, K. Muthusamy, A. K. Patil, V. Mathew and M. Alexander (2017). "Sonothrombolysis for acute ischemic stroke - Break on through to the other side." Neurol India **65**(1): 52-57.

Adams, H. P., Jr., B. H. Bendixen, L. J. Kappelle, J. Biller, B. B. Love, D. L. Gordon and E. E. Marsh, 3rd (1993). "Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment." Stroke **24**(1): 35-41.

Ahmed, N., N. Wahlgren, M. Brainin, J. Castillo, G. A. Ford, M. Kaste, K. R. Lees and D. Toni (2009). "Relationship of blood pressure, antihypertensive therapy, and outcome in ischemic stroke treated with intravenous thrombolysis: retrospective analysis from Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-International Stroke Thrombolysis Register (SITS-ISTR)." Stroke **40**(7): 2442-2449.

Albers, G. W., M. P. Marks, S. Kemp, S. Christensen, J. P. Tsai, S. Ortega-Gutierrez, R. A. McTaggart, M. T. Torbey, M. Kim-Tenser, T. Leslie-Mazwi, A. Sarraj, S. E. Kasner, S. A. Ansari, S. D. Yeatts, S. Hamilton, M. Mlynash, J. J. Heit, G. Zaharchuk, S. Kim, J. Carrozzella, Y. Y. Palesch, A. M. Demchuk, R. Bammer, P. W. Lavori, J. P. Broderick, M. G. Lansberg and D. Investigators (2018). "Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging." N Engl J Med **378**(8): 708-718.

Alexandrov, A. V. (2009). "Ultrasound enhancement of fibrinolysis." Stroke **40**(3 Suppl): S107-110.

Alexandrov, A. V., M. Köhrmann, L. Soenne, G. Tsivgoulis, A. D. Barreto, A. M. Demchuk, V. K. Sharma, R. Mikulik, K. W. Muir, G. Brandt, J. Alleman, J. C. Grotta, C. R. Levi, C. A. Molina, M. Saqqur, D. Mavridis, T. Psaltopoulou, M. Vosko, J. B. Fiebach, P. Mandava, T. A. Kent, A. W. Alexandrov and P. D. Schellinger (2019). "Safety and efficacy of sonothrombolysis for acute ischaemic stroke: a multicentre, double-blind, phase 3, randomised controlled trial." The Lancet Neurology **18**(4): 338-347.

Alexandrov, A. V., C. A. Molina, J. C. Grotta, Z. Garami, S. R. Ford, J. Alvarez-Sabin, J. Montaner, M. Saqqur, A. M. Demchuk, L. A. Moyé, M. D. Hill and A. W. Wojner (2004). "Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke." N Engl J Med **351**(21): 2170-2178.

Alexandrov, A. V., C. A. Molina, J. C. Grotta, Z. Garami, S. R. Ford, J. Alvarez-Sabin, J. Montaner, M. Saqqur, A. M. Demchuk, L. A. Moyé, M. D. Hill and A. W. Wojner (2004). "Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke." The New England journal of medicine **351**(21): 2170-2178.

Alexandrov, A. V., G. Tsivgoulis, M. Köhrmann, A. H. Katsanos, L. Soenne, A. D. Barreto, T. Rothlisberger, V. K. Sharma, R. Mikulik, K. W. Muir, C. R. Levi, C. A. Molina, M. Saqqur, D. Mavridis, T. Psaltopoulou, M. R. Vosko, J. B. Fiebach, P. Mandava, T. A. Kent, A. W. Alexandrov and P. D. Schellinger (2019). "Endovascular equipoise shift in a phase III randomized clinical trial of sonothrombolysis for acute ischemic stroke." Therapeutic Advances in Neurological Disorders **12**.

Alexandrov, A. V., A. W. Wojner and J. C. Grotta (2004). "CLOTBUST: Design of a Randomized Trial of Ultrasound-Enhanced Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke." Journal of Neuroimaging **14**(2): 108-112.

Allmendinger, A. M., E. R. Tang, Y. W. Lui and V. Spektor (2012). "Imaging of stroke: Part 1, Perfusion CT--overview of imaging technique, interpretation pearls, and common pitfalls." AJR Am J Roentgenol **198**(1): 52-62.

Alonso, A., C.-E. Dempfle, A. Della Martina, M. Stroick, M. Fatar, K. Zohsel, E. Allémann, M. G. Hennerici and S. Meairs (2009). "In vivo clot lysis of human thrombus with intravenous abciximab immunobubbles and ultrasound." Thrombosis Research **124**(1): 70-74.

Auboire, L., C. A. Sennoga, J.-M. Hyvelin, F. Ossant, J.-M. Escoffre, F. Tranquart and A. Bouakaz (2018). "Microbubbles combined with ultrasound therapy in ischemic stroke: A systematic review of in-vivo preclinical studies." PloS one **13**(2): e0191788.

Bader, K. B., M. J. Gruber and C. K. Holland (2015). "Shaken and stirred: mechanisms of ultrasound-enhanced thrombolysis." Ultrasound Med Biol **41**(1): 187-196.

Barlinn, K., G. Tsvigoulis, A. D. Barreto, J. Alleman, C. A. Molina, R. Mikulik, M. Saqur, A. M. Demchuk, P. D. Schellinger, G. Howard and A. V. Alexandrov (2014). "Outcomes following sonothrombolysis in severe acute ischemic stroke: subgroup analysis of the CLOTBUST trial." International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society **9**(8): 1006–1010.

Barow, E. and G. Thomalla (2019). "[Acute treatment of ischemic stroke : Current standards]." Nervenarzt **90**(10): 979-986.

Behrens, S., M. Daffertshofer, D. Spiegel and M. Hennerici (1999). "Low-frequency, low-intensity ultrasound accelerates thrombolysis through the skull." Ultrasound in medicine & biology **25**(2): 269–273.

Bracard, S., X. Ducrocq, J. L. Mas, M. Soudant, C. Oppenheim, T. Moulin and F. Guillemin (2016). "Mechanical thrombectomy after intravenous alteplase versus alteplase alone after stroke (THRACE): A randomised controlled trial." The Lancet Neurology **15**(11): 1138–1147.

Braun, T. (2021). Experimentelle und klinische Behandlungsansätze zur Verbesserung des Behandlungserfolgs beim ischämischen Schlaganfall Habilitationsschrift, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Brown, A. T., R. Flores, E. Hamilton, P. K. Roberson, M. J. Borrelli and W. C. Culp (2011). "Microbubbles improve sonothrombolysis in vitro and decrease hemorrhage in vivo in a rabbit stroke model." Investigative radiology **46**(3): 202–207.

Carmichael, S. T. (2005). "Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose." NeuroRx **2**(3): 396-409.

Charidimou, A., A. Shoamanesh and M.-M. I. International (2016). "Clinical relevance of microbleeds in acute stroke thrombolysis: Comprehensive meta-analysis." Neurology **87**(15): 1534-1541.

- Chen, Z., T. Xue, H. Huang, J. Xu, S. Shankar, H. Yu and Z. Wang (2019). "Efficacy and safety of sonothrombolysis versus non-sonothrombolysis in patients with acute ischemic stroke: A meta-analysis of randomized controlled trials." PLoS One **14**(1): e0210516.
- Daffertshofer, M., A. Gass, P. Ringleb, M. Sitzer, U. Sliwka, T. Els, O. Sedlacek, W. J. Koroshetz and M. G. Hennerici (2005). "Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia: increased risk of hemorrhage with combined ultrasound and tissue plasminogen activator: results of a phase II clinical trial." Stroke **36**(7): 1441–1446.
- Daffertshofer, M., Z. Huang, M. Fatar, M. Popolo, H. Schroeck, W. Kuschinsky, M. A. Moskowitz and M. G. Hennerici (2004). "Efficacy of sonothrombolysis in a rat model of embolic ischemic stroke." Neuroscience letters **361**(1-3): 115–119.
- Damianou, C., V. Hadjisavvas and K. Ioannides (2014). "In Vitro and In Vivo evaluation of a magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound system for dissolving clots in combination with thrombolytic drugs." Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association **23**(7): 1956–1964.
- Datta, S., C.-C. Coussios, A. Y. Ammi, T. D. Mast, G. M. de Courten-Myers and C. K. Holland (2008). "Ultrasound-enhanced thrombolysis using Definity as a cavitation nucleation agent." Ultrasound in medicine & biology **34**(9): 1421–1433.
- Diener HC, H. W., Bush E (2003). "Zerebrale Ischämie: Epidemiologie und Verlauf." Kohlammer **347**.
- Dirnagl, U., C. Iadecola and M. A. Moskowitz (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." Trends Neurosci **22**(9): 391-397.
- Disharoon, D., D. W. M. Marr and K. B. Neeves (2019). "Engineered microparticles and nanoparticles for fibrinolysis." J Thromb Haemost.
- Dixon, A. J., J. Li, J.-M. R. Rickel, A. L. Klibanov, Z. Zuo and J. A. Hossack (2019). "Efficacy of Sonothrombolysis Using Microbubbles Produced by a Catheter-Based Microfluidic Device in a Rat Model of Ischemic Stroke." Annals of biomedical engineering.
- Dixon, A. J., J. Li, J. R. Rickel, A. L. Klibanov, Z. Zuo and J. A. Hossack (2019). "Efficacy of Sonothrombolysis Using Microbubbles Produced by a Catheter-Based Microfluidic Device in a Rat Model of Ischemic Stroke." Ann Biomed Eng **47**(4): 1012-1022.
- Dixon, A. J., J. M. R. Rickel, B. D. Shin, A. L. Klibanov and J. A. Hossack (2018). "In Vitro Sonothrombolysis Enhancement by Transiently Stable Microbubbles Produced by a Flow-Focusing Microfluidic Device." Annals of biomedical engineering **46**(2): 222–232.
- Eggers, J., B. Koch, K. Meyer, I. König and G. Seidel (2003). "Effect of ultrasound on thrombolysis of middle cerebral artery occlusion." Annals of neurology **53**(6): 797–800.
- Eggers, J., I. R. König, B. Koch, G. Händler and G. Seidel (2008). "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 **39**(5): 1470–1475.

Everbach, E. C. and C. W. Francis (2000). "Cavitation mechanisms in ultrasound-accelerated thrombolysis at 1 MHz." *Ultrasound in medicine & biology* **26**(7): 1153–1160.

Fan, Y., J. Yu, H. Chen, J. Zhang, J. Duan, D. Mo, W. Zhu, B. Wang, F. Ouyang, Y. Chen, L. Lan, J. Zeng and C. G. W. C. Chinese Stroke Association Stroke Council (2020). "Chinese Stroke Association guidelines for clinical management of cerebrovascular disorders: executive summary and 2019 update of clinical management of cerebral venous sinus thrombosis." *Stroke Vasc Neurol* **5**(2): 152-158.

Fluri, F., M. K. Schuhmann and C. Kleinschnitz (2015). "Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research." *Drug Des Devel Ther* **9**: 3445-3454.

Fluri, F., M. K. Schuhmann and C. Kleinschnitz (2015). "Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research." *Drug design, development and therapy* **9**: 3445–3454.

Frenkel, V., J. Oberoi, M. J. Stone, M. Park, C. Deng, B. J. Wood, Z. Neeman, M. Horne, 3rd and K. C. Li (2006). "Pulsed high-intensity focused ultrasound enhances thrombolysis in an in vitro model." *Radiology* **239**(1): 86-93.

Gerriets, T., F. Li, M. D. Silva, X. Meng, M. Brevard, C. H. Sotak and M. Fisher (2003). "The macrosphere model." *Journal of Neuroscience Methods* **122**(2): 201-211.

Gerriets, T., E. Stolz, M. Walberer, C. Müller, A. Kluge, A. Bachmann, M. Fisher, M. Kaps and G. Bachmann (2004). "Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging." *Stroke* **35**(2): 566-571.

Goyal, M., B. K. Menon, W. H. van Zwam, D. W. Dippel, P. J. Mitchell, A. M. Demchuk, A. Dávalos, C. B. Majoie, A. van der Lugt, M. A. de Miquel, G. A. Donnan, Y. B. Roos, A. Bonafe, R. Jahan, H. C. Diener, L. A. van den Berg, E. I. Levy, O. A. Berkhemer, V. M. Pereira, J. Rempel, M. Millán, S. M. Davis, D. Roy, J. Thornton, L. S. Román, M. Ribó, D. Beumer, B. Stouch, S. Brown, B. C. Campbell, R. J. van Oostenbrugge, J. L. Saver, M. D. Hill and T. G. Jovin (2016). "Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials." *Lancet* **387**(10029): 1723-1731.

Hacke, W., M. Kaste, E. Bluhmki, M. Brozman, A. Dávalos, D. Guidetti, V. Larrue, K. R. Lees, Z. Medeghri, T. Machnig, D. Schneider, R. von Kummer, N. Wahlgren and D. Toni (2008). "Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke." *N Engl J Med* **359**(13): 1317-1329.

Hacke, W., M. Kaste, E. Bluhmki, M. Brozman, A. Dávalos, D. Guidetti, V. Larrue, K. R. Lees, Z. Medeghri, T. Machnig, D. Schneider, R. von Kummer, N. Wahlgren, D. Toni and E. Investigators (2008). "Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke." *N Engl J Med* **359**(13): 1317-1329.

Hart, R. G., H.-C. Diener, S. B. Coutts, J. D. Easton, C. B. Granger, M. J. O'Donnell, R. L. Sacco and S. J. Connolly (2014). "Embolic strokes of undetermined source: the case for a new clinical construct." *The Lancet Neurology* **13**(4): 429–438.

Howells, D. W., M. J. Porritt, S. S. Rewell, V. O'Collins, E. S. Sena, H. B. van der Worp, R. J. Traystman and M. R. Macleod (2010). "Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **30**(8): 1412-1431.

Howells, D. W., M. J. Porritt, S. S. J. Rewell, V. O'Collins, E. S. Sena, H. B. van der Worp, R. J. Traystman and M. R. Macleod (2010). "Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia." Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism **30**(8): 1412–1431.

Jones, B. J. and D. J. Roberts (1968). "The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod." J Pharm Pharmacol **20**(4): 302-304.

Jung, S., C. Stapf and M. Arnold (2015). "Stroke unit management and revascularisation in acute ischemic stroke." European neurology **73**(1-2): 98–105.

Koizumi, J. (1986). "Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area." Jpn J Stroke **8**: 1-8.

Langhorne, P. and A. Pollock (2002). "What are the components of effective stroke unit care?" Age Ageing **31**(5): 365-371.

Langhorne, P., S. Ramachandra and C. Stroke Unit Trialists (2020). "Organised inpatient (stroke unit) care for stroke: network meta-analysis." Cochrane Database Syst Rev **4**: CD000197.

Lee, R. M. (1995). "Morphology of cerebral arteries." Pharmacology & therapeutics **66**(1): 149–173.

Lee, T.-H., J.-C. Yeh, C.-H. Tsai, J.-T. Yang, S.-L. Lou, C.-J. Seak, C.-Y. Wang, K.-C. Wei and H.-L. Liu (2017). "Improved thrombolytic effect with focused ultrasound and neuroprotective agent against acute carotid artery thrombosis in rat." Scientific reports **7**(1): 1638.

Li, D. J., Y. H. Li, H. B. Yuan, L. F. Qu and P. Wang (2017). "The novel exercise-induced hormone irisin protects against neuronal injury via activation of the Akt and ERK1/2 signaling pathways and contributes to the neuroprotection of physical exercise in cerebral ischemia." Metabolism **68**: 31-42.

Lu, Y., J. Wang, R. Huang, G. Chen, L. Zhong, S. Shen, C. Zhang, X. Li, S. Cao, W. Liao, Y. Liao and J. Bin (2016). "Microbubble-Mediated Sonothrombolysis Improves Outcome After Thrombotic Microembolism-Induced Acute Ischemic Stroke." Stroke **47**(5): 1344-1353.

Lu, Y., J. Wang, R. Huang, G. Chen, L. Zhong, S. Shen, C. Zhang, X. Li, S. Cao, W. Liao, Y. Liao and J. Bin (2016). "Microbubble-Mediated Sonothrombolysis Improves Outcome After Thrombotic Microembolism-Induced Acute Ischemic Stroke." Stroke **47**(5): 1344–1353.

Lyden, P. D. (2019). "Thrombolytic Therapy for Acute Ischemic Stroke." Stroke **50**(9): 2597-2603.

- Ma, W., C. Y. Li, S. J. Zhang, C. H. Zang, J. W. Yang, Z. Wu, G. D. Wang, J. Liu, W. Liu, K. P. Liu, Y. Liang, X. K. Zhang, J. J. Li, J. H. Guo and L. Y. Li (2022). "Neuroprotective effects of long noncoding RNAs involved in ischemic postconditioning after ischemic stroke." Neural Regen Res **17**(6): 1299-1309.
- Ma, Y., L. Li, Z. Niu, J. Song, Y. Lin, H. Zhang and G. Du (2016). "Effect of recombinant plasminogen activator timing on thrombolysis in a novel rat embolic stroke model." Pharmacological research **107**: 291–299.
- Masomi-Bornwasser, J., P. Winter, H. Müller-Werkmeister, S. Strand, J. König, O. Kempfski, F. Ringel, S. R. Kantelhardt and N. Keric (2017). "Combination of ultrasound and rtPA enhances fibrinolysis in an In Vitro clot system." PloS one **12**(11): e0188131.
- Mearns, S., A. Alonso and M. G. Hennerici (2012). "Progress in sonothrombolysis for the treatment of stroke." Stroke **43**(6): 1706-1710.
- Mikulik, R. and A. V. Alexandrov (2006). "Acute stroke: therapeutic transcranial Doppler sonography." Frontiers of neurology and neuroscience **21**: 150–161.
- Molina, C. A., A. D. Barreto, G. Tsivgoulis, P. Sierzenski, M. D. Malkoff, M. Rubiera, N. Gonzales, R. Mikulik, G. Pate, J. Ostrem, W. Singleton, G. Manvelian, E. C. Unger, J. C. Grotta, P. D. Schellinger and A. V. Alexandrov (2009). "Transcranial ultrasound in clinical sonothrombolysis (TUCSON) trial." Ann Neurol **66**(1): 28-38.
- Molina, C. A., M. Ribo, M. Rubiera, J. Montaner, E. Santamarina, R. Delgado-Mederos, J. F. Arenillas, R. Huertas, F. Purroy, P. Delgado and J. Alvarez-Sabin (2006). "Microbubble Administration Accelerates Clot Lysis During Continuous 2-MHz Ultrasound Monitoring in Stroke Patients Treated With Intravenous Tissue Plasminogen Activator." Stroke **37**(2): 425-429.
- Mori, E., Y. Yoneda, M. Tabuchi, T. Yoshida, S. Ohkawa, Y. Ohsumi, K. Kitano, A. Tsutsumi and A. Yamadori (1992). "Intravenous recombinant tissue plasminogen activator in acute carotid artery territory stroke." Neurology **42**(5): 976-982.
- Moumouh, A., L. Barentin, F. Tranquart, S. Serrierre, I. Bonnaud and J. P. Tasu (2010). "Fibrinolytic Effects of Transparietal Ultrasound Associated with Intravenous Infusion of an Ultrasound Contrast Agent: Study of a Rat Model of Acute Cerebral Stroke." Ultrasound in Medicine & Biology **36**(1): 51-57.
- Nacu, A., C. E. Kvistad, H. Naess, H. Øygarden, N. Logallo, J. Assmus, U. Waje-Andreassen, K. D. Kurz, G. Neckelmann and L. Thomassen (2017). "NOR-SASS (Norwegian Sonothrombolysis in Acute Stroke Study)." Stroke **48**(2): 335-341.
- National Institute of Neurological, D. and P. A. S. S. G. Stroke rt (1995). "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke." N Engl J Med **333**(24): 1581-1587.
- Nedelmann, M. (2010). "Experimentelle und klinische Grundlagen der Sonothrombolyse." Klinische Neurophysiologie **41**(04): 263-268.
- Nedelmann, M., C. Brandt, F. Schneider, B. M. Eicke, O. Kempfski, F. Krummenauer and M. Dieterich (2005). "Ultrasound-induced blood clot dissolution without a thrombolytic drug is

more effective with lower frequencies." Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland) **20**(1): 18–22.

Nedelmann, M., T. Gerriets and M. Kaps (2008). "Therapeutische Ultraschallbehandlung des akuten Hirnarterienverschlusses." Der Nervenarzt **79**(12): 1399-1400, 1402-1396.

Nedelmann, M., N. Ritschel, S. Doenges, A. C. Langheinrich, T. Acker, P. Reuter, M. Yeniguen, J. Pukropski, M. Kaps, C. Mueller, G. Bachmann and T. Gerriets (2010). "Combined contrast-enhanced ultrasound and rt-PA treatment is safe and improves impaired microcirculation after reperfusion of middle cerebral artery occlusion." Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism **30**(10): 1712–1720.

Nedelmann, M., T. Wilhelm-Schwenkmezger, B. Alessandri, A. Heimann, F. Schneider, B. M. Eicke, M. Dieterich and O. Kempfski (2007). "Cerebral embolic ischemia in rats: correlation of stroke severity and functional deficit as important outcome parameter." Brain research **1130**(1): 188–196.

Nogueira, R. G., A. P. Jadhav, D. C. Haussen, A. Bonafe, R. F. Budzik, P. Bhuva, D. R. Yavagal, M. Ribo, C. Cognard, R. A. Hanel, C. A. Sila, A. E. Hassan, M. Millan, E. I. Levy, P. Mitchell, M. Chen, J. D. English, Q. A. Shah, F. L. Silver, V. M. Pereira, B. P. Mehta, B. W. Baxter, M. G. Abraham, P. Cardona, E. Veznedaroglu, F. R. Hellinger, L. Feng, J. F. Kirmani, D. K. Lopes, B. T. Jankowitz, M. R. Frankel, V. Costalat, N. A. Vora, A. J. Yoo, A. M. Malik, A. J. Furlan, M. Rubiera, A. Aghaebrahim, J. M. Olivot, W. G. Tekle, R. Shields, T. Graves, R. J. Lewis, W. S. Smith, D. S. Liebeskind, J. L. Saver, T. G. Jovin and D. T. Investigators (2018). "Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct." N Engl J Med **378**(1): 11-21.

Randolph, S. A. (2016). "Ischemic Stroke." Workplace health & safety **64**(9): 444.

Reinhard, M., C. A. Taschner, N. Hörsch, A. Allignol, C. J. Maurer, W.-D. Niesen, J. Lambeck, C. W. Wallesch, H. Urbach, C. Weiller, V. Schuchardt and H.-J. Griesser-Leute (2015). "Endovascular Treatment versus Sonothrombolysis for Acute Ischemic Stroke." Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland) **40**(5-6): 205–214.

Ren, X., Y. Wang, Y. Wang, H. Chen, L. Chen, Y. Liu and C. Xue (2015). "Thrombolytic therapy with rt-PA and transcranial color Doppler ultrasound (TCCS) combined with microbubbles for embolic thrombus." Thrombosis research **136**(5): 1027-1032.

Ren, X., Y. Wang, Y. Wang, H. Chen, L. Chen, Y. Liu and C. Xue (2015). "Thrombolytic therapy with rt-PA and transcranial color Doppler ultrasound (TCCS) combined with microbubbles for embolic thrombus." Thrombosis research **136**(5): 1027–1032.

Sandercock, P., R. Lindley, J. Wardlaw, M. Dennis, S. Lewis, G. Venables, A. Kobayashi, A. Czlonkowska, E. Berge, K. B. Slot, V. Murray, A. Peeters, G. Hankey, K. Matz, M. Brainin, S. Ricci, M. G. Celani, E. Righetti, T. Cantisani, G. Gubitzi, S. Phillips, A. Arauz, K. Prasad, M. Correia, P. Lyrrer and I. S. T. C. Group (2008). "Third international stroke trial (IST-3) of thrombolysis for acute ischaemic stroke." Trials **9**: 37.

Sandercock, P. A., C. Counsell and M. C. Tseng (2008). "Low-molecular-weight heparins or heparinoids versus standard unfractionated heparin for acute ischaemic stroke." Cochrane Database Syst Rev(3): Cd000119.

Saver, J. L., M. Goyal, A. Bonafe, H. C. Diener, E. I. Levy, V. M. Pereira, G. W. Albers, C. Cognard, D. J. Cohen, W. Hacke, O. Jansen, T. G. Jovin, H. P. Mattle, R. G. Nogueira, A. H. Siddiqui, D. R. Yavagal, B. W. Baxter, T. G. Devlin, D. K. Lopes, V. K. Reddy, R. du Mesnil de Rochemont, O. C. Singer, R. Jahan and S. P. Investigators (2015). "Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke." N Engl J Med **372**(24): 2285-2295.

Schellinger, P. D., A. V. Alexandrov, A. D. Barreto, A. M. Demchuk, G. Tsivgoulis, M. Kohrmann, J. Alleman, V. Howard, G. Howard, A. W. Alexandrov, G. Brandt, C. A. Molina and C. Investigators (2015). "Combined lysis of thrombus with ultrasound and systemic tissue plasminogen activator for emergent revascularization in acute ischemic stroke (CLOTBUST-ER): design and methodology of a multinational phase 3 trial." Int J Stroke **10**(7): 1141-1148.

Schleicher, N., A. J. Tomkins, M. Kampschulte, J.-M. Hyvelin, C. Botteron, M. Juenemann, M. Yeniguen, G. A. Krombach, M. Kaps, N. J. Spratt, T. Gerriets and M. Nedelmann (2016). "Sonothrombolysis with BR38 Microbubbles Improves Microvascular Patency in a Rat Model of Stroke." PloS one **11**(4): e0152898.

Siddiqi, F., T. M. Odrlijn, P. J. Fay, C. Cox and C. W. Francis (1998). "Binding of tissue-plasminogen activator to fibrin: effect of ultrasound." Blood **91**(6): 2019-2025.

Sobesky, J. (2009). "[Therapy of acute ischemic stroke]." Internist (Berl) **50**(11): 1218-1226.

Synhaeve, N. E., R. M. Arntz, M. E. van Alebeek, J. van Pamelan, N. A. M. Maaijwee, L. C. A. Rutten-Jacobs, H. C. Schoonderwaldt, P. L. M. de Kort, E. J. van Dijk and F.-E. d. Leeuw (2016). "Women have a poorer very long-term functional outcome after stroke among adults aged 18-50 years: the FUTURE study." Journal of neurology **263**(6): 1099–1105.

Thomalla, G., C. Z. Simonsen, F. Boutitie, G. Andersen, Y. Berthezene, B. Cheng, B. Cheripelli, T. H. Cho, F. Fazekas, J. Fiehler, I. Ford, I. Galinovic, S. Gellissen, A. Golsari, J. Gregori, M. Gunther, J. Guibernau, K. G. Hausler, M. Hennerici, A. Kemmling, J. Marstrand, B. Modrau, L. Neeb, N. Perez de la Ossa and J. Puig (2018). "MRI-Guided Thrombolysis for Stroke with Unknown Time of Onset." **379**(7): 611-622.

Tomkins, A. J., N. Schleicher, L. Murtha, M. Kaps, C. R. Levi, M. Nedelmann and N. J. Spratt (2015). "Platelet rich clots are resistant to lysis by thrombolytic therapy in a rat model of embolic stroke." Experimental & Translational Stroke Medicine **7**(1).

Topcuoglu, M. A., E. Saka and M. Z. Onal (2006). "Hyperoxia potentiated sonothrombolysis as a method of acute ischemic stroke therapy." Medical hypotheses **66**(1): 59–65.

Tyagi, S., N. Singh, J. K. Viridi and A. S. Jaggi (2019). "Diabetes abolish cardioprotective effects of remote ischemic conditioning: evidences and possible mechanisms." J Physiol Biochem **75**(1): 19-28.

Wahlgren, N., N. Ahmed, A. Dávalos, W. Hacke, M. Millán, K. Muir, R. O. Roine, D. Toni and K. R. Lees (2008). "Thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study." Lancet **372**(9646): 1303-1309.

Walberer, M., N. Ritschel, M. Nedelmann, K. Volk, C. Mueller, M. Tschernatsch, E. Stolz, F. Blaes, G. Bachmann and T. Gerriets (2008). "Aggravation of infarct formation by brain swelling in a large territorial stroke: a target for neuroprotection?" J Neurosurg **109**(2): 287-293.

Walberer, M., E. Stolz, C. Müller, C. Friedrich, C. Rottger, F. Blaes, M. Kaps, M. Fisher, G. Bachmann and T. Gerriets (2006). "Experimental stroke: ischaemic lesion volume and oedema formation differ among rat strains (a comparison between Wistar and Sprague-Dawley rats using MRI)." Lab Anim **40**(1): 1-8.

Yew, K. S. and E. M. Cheng (2015). "Diagnosis of acute stroke." Am Fam Physician **91**(8): 528-536.

Anhang:

Abkürzungsverzeichnis

ACC – Arteria Carotis Communis
ACE – Arteria Carotis Externa
ACI – Arteria Carotis Interna
ACM – Arteria Carotis Media
ACP – Arteria Carotis Pterygopalatina
AHA - American Heart Association
AIS – acute ischemic stroke
ASA – American Stroke Association
BGA - Blutgasanalyse
BR - Bracco
CBF – cerebral blood flow
CBV – zerebrales regionales Blutvolumen
CLOTBUST Studie - Combined Lysis of Thrombus in Brain Ischemia
CT – Computertomographie
DTI – Diffusion Tensor Imaging
DWI – diffusion weighted imaging
ECASS - European Cooperative Acute Stroke Study
EKG - Echokardiographie
ENI - early neurologic improvement
ESUS - embolic stroke of undetermined source
FLAIR – fluid attenuated inversion recovery
FOV – Field of View
FUS – focused Ultrasound
H + E Färbung – Hämatoxylin und Eosin Färbung
HCL - Hydrochlorid
ICH – Intrazerebrale Hämorrhagien
IR – alternierende transiente Ischämie oder Reperfusion
ISP – in situ ischämische Postkonditionierung
MCAO – middle cerebral artery occlusion
MB – Microbubbles
MHz – Megahertz

MRT – Magnetresonanztomographie
NaCl - Natriumchlorid
NINDS - National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NIHSS – National Institute of Health Stroke Score
PE - Polyethylen
PEG – Polyethylenglykol
PI3K – Phosphoinositid-3-Kinase
RARE - Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement
RF-Puls – Radiofrequenz Puls
RIP – ferngesteuerte ischämische Postkonditionierung
RPM – Rounds Per Minute
rt-PA - recombinant tissue-type - plasminogen activator
SWI - Suszeptibilitätsgewichtete Bildgebung
TCCD – transkranielle farbkodierte Duplexsonographie
TCCS - Transcranial color-coded duplex sonography
TCD – transkranieller Doppler
TE – Echozeit
TEE – Transösophageale Echokardiographie
TTE – Transthorakale Echokardiographie
TOAST-Kriterien – Trial of ORG 10172 Acute Stroke Treatment
tPA – tissue Plasminogen Activator
TR – Repetitionszeit
TRUMBI Trial - Transcranial Low-Frequency Ultrasound-Mediated Thrombolysis in Brain Ischemia
 μm – Micrometer
WHO – World Health Organisation
WU – Wistar-Unilever Ratten

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abbildung einer nativen CT-Untersuchung- von einem Gehirn eines Menschen mit ischämischem Schlaganfall (rot eingekreist). Es handelt sich um einen nahezu kompletten Infarkt der A. cerebri media.

Abbildung 2: Circulus arteriosus cerebri beim Menschen.

Abbildung 3: Aufzweigungen der Arteria Carotis Communis bei der Ratte.

- Abbildung 4: Ratte in einem Makrolon-Käfig von Typ IV.
- Abbildung 5: Blutabnahme aus der V. caudalis mediana bei einer Ratte.
- Abbildung 6: Hautschnitt zur Vorbereitung der Sonde des Laser-Dopplers.
- Abbildung 7: fixierter PE- 10 in der A. Carotis externa.
- Abbildung 8: Lage der Dopplersonde auf der Schädeldecke.
- Abbildung 9: Zeitpunkte der Medikamentengabe. rt-PA: 10 mg/kg Körpergewicht, 10% als Bolus dann über eine Stunde jeweils 18 Prozent alle 10 Minuten. BR38: 0.1 ml Boli
- Abbildung 10: Neuroscore nach Nedelmann (Nedelmann, Wilhelm-Schwenkmezger et al. 2007) zur Beurteilung des akuten Schlaganfalles bei den Ratten.
- Abbildung 11: Ratte auf einem Rotarod-Rad nach Jones und Roberts (Jones and Roberts 1968).
- Abbildung 12: 7T-Magnetresonanztomographie des Max-Planck Institut in Bad Nauheim, DE.
- Abbildung 13: Darstellung eines ausgemessenen Gehirns einer Ratte.
Rot eingekreist: ipsilaterale Hemisphäre
Grün eingekreist: contralaterale Hemisphäre
Lila eingekreist: Ischämisches Areal
- Abbildung 14: entnommenes Rattengehirn eingelegt in 4% Formalin.
- Abbildung 15: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen des Neuroscore-Test 24h nach der Operation. Höhere Werte zeigen eine stärkere klinische Beeinträchtigung an.
- Abbildung 16: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen des Rotarod-Test 24h nach Operation. Niedrigere Werte zeigen eine stärkere klinische Beeinträchtigung an.
- Abbildung 17: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen der Infarktgröße in cm^3 90 min nach der Operation. Ausgewertet wurde die MSME_T2Q Sequenz.
- Abbildung 18: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen der Infarktvolumina in cm^3 24h nach Operation. Ausgewertet wurde die MSME_T2Q Sequenz.
- Abbildung 19: Unterschiede der Infarktvolumina in den einzelnen Behandlungsgruppen im Verlauf der ersten (90min) zu zweiter Messung (24h). Dargestellt in der MSME_T2Q Sequenz.
Placebogruppe: nach 90min (A), nach 24h (B)

Ultraschall, BR38 – Gruppe: nach 90min (C), nach 24h (D)

rt-PA – Gruppe: nach 90min (E), nach 24h (F)

Kombinationsgruppe: nach 90min (G), nach 24h (H)

Abbildung 20: Darstellung der Mittelwerte der Infarktgrößen in cm^3 aufgeteilt in die Behandlungsgruppen

Abbildung 21: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen der unkorrigierten Volumenverhältnisse in % 90min nach der Operation.

Abbildung 22: Darstellung Mittelwerte mit Standardabweichungen der unkorrigierten Volumenverhältnisse in % 24h nach Operation aufgeteilt in die Behandlungsgruppen.

Abbildung 23: Darstellung der Mittelwerte des unkorrigiertes Volumenverhältnis in % aufgeteilt in die Behandlungsgruppen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilung der überlebten Tiere aufgeteilt in die Behandlungsgruppen

Tabelle 2: Anzahl der Tiere, die eine intrazerebrale Blutung aufweisen, in %.

Tabelle 3: Anzahl der Tiere, die eine intrazerebrale Blutung aufweisen in %.

Tabelle 4: Anzahl der Tiere, die eine Mikroblutung im Gehirn aufweisen, in %

Materialliste

Laborgeräte

- Rapidlab 348 mit Zubehör, Siemens Healthineers, Erlangen, DE
- Oxyflow 2000 Microvascular Perfusion Monitor mit Sonde, Oxford Optronix, Milton, UK
- Rotarod selbstgebaut von der Medizintechnik des Max-Planck-Instituts, Bad Nauheim, DE
- Narkose Gerät, Stephan, Gackenbach, DE
- Glasglocke selbstgebaut von der Medizintechnik des Max-Planck-Instituts, Bad Nauheim, DE
- Minicutter, KLS Martin, Tuttlingen, DE
- Haarrasierer, Remington, Middleton, USA
- Wasserbad B3, Haake , Dreieich, DE

- Ultraschallgerät Sonos 7500, Phillips Healthcare, Nevada, USA
- Guillotine selbstgebaut von der Medizintechnik des Max-Planck-Instituts, Bad Nauheim, DE
- Inkubator Hera Cell150, Thermo Scientific, Waltham, GB
- Kühlschrank und Gefrierkombination, Siemens, München, DE
- Operationsmikroskop OPMI pico, Carl Zeiss Inc., Wetzlar, DE
- Permanentmarker, edding Vertrieb GmbH, Wunstorf, DE
- Digital-Thermometer, Scheiber GmbH, Kreuzwertheim, DE
- Mikrotom Leica SM 2000R, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, DE
- Axio Scan Z1, Carl Zeiss Inc., Wetzlar, DE

Verbrauchsmaterial

- HS Zellstofftupfer 4x5cm, Covetrus, Portland, USA
- Mullkompressen, Fuhrmann, Much, DE
- HS Wattestäbchen small 15cm , Covetrus, Portland, USA
- Perma-Hand Seide 0, Ethicon, Somerville, USA
- Perma-Hand Seide 4-0 , Ethicon, Somerville, USA
- PE-50 Katheter , Warner Instruments, Hamden, USA
- PE-10 Katheter, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
- HS Tuberkulin Einmalspritzen 1ml, Covetrus, Portland, USA
- Einmalspritzen Injekt 2 ml, B. Braun, Melsungen, DE
- Einmalspritzen Injekt 5 ml, B. Braun, Melsungen, DE
- Einmalspritzen Injekt 10 ml, B. Braun, Melsungen, DE
- Vasovet Braunüle 24G, B. Braun, Melsungen, DE
- HS Einmal-Kanülen lange Spitze 18G, Covetrus, Portland, USA
- HS Einmal-Kanülen 20G, Covetrus, Portland, USA
- HS Einmal-Kanülen 24G, Covetrus, Portland, USA
- HS Einmal-Kanülen 30G, Covetrus, Portland, USA
- Natriumchloridlösung 0,9%, Bela-Pharm GmbH, Vechta, DE
- Weißes Vaseline Lichtenstein DAB, Winthrop Arzneimittel, Frankfurt, De
- Hämatokrit-Kapillaren, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
- Brozell Tücher, Brod GmbH, Hanau, DE

- Alkoholisches Hautantiseptikum Kodan Tinktur Forte, Schülke & Mayr, Norderstedt, DE
- Leukosilk, BSN medical GmbH, Hamburg, DE
- Rotilab Schraubdeckeldosen, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
- Roti-Histofix 4%, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
- Ultraschallgel, Transatlantic Handelsgesellschaft Stolpe & Co. mbH, Neu-Anspach, DE
- Altromin 1324 Haltungsdiät, Altromin Spezialfutter GmbH & Co KG, Lage, DE
- Lignocel FS 14, Rettenmaier und Söhne GmbH & Co KG, Rosenberg, DE
- Mikrotomklingen S 35, FEATHER, Osaka, JPN
- Objektträger R Superfrost Plus, Langenbrinck GmbH, Emmendingen
- Deckgläschen R 24x36 mm Glasdicke 0,13-0,16, Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE
- Xylol VWR 2,5l, VWR International, Radnor, USA
- Ethanol Sigma Aldrich 1l, Merck, Darmstadt, DE
- Eosin G Lösung Roth 1l, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
- Hämalaun Lösung sauer nach Meyer 1l, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
- Eindeckmedium CYTOSEAL XYL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Operationsbesteck, Aesculap AG & CoKG, Tuttlingen – DE

Medikamente

- Buprenovet, Bayer AG, Leverkusen, DE
- Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer AG, Leverkusen, DE
- Isofluran, CP-Pharma, Burgdorf, DE
- Lidocain-HCl 2%, B. Braun, Melsungen, DE
- SA BG 8610, Bracco Suisse, Geneva, CH
- Actilyse 10mg, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, DE

MRT

- MRT 7T, Bruker, Billerica, USA
- Computersoftware Paravision 6.0.1, Bruker, Billerica, USA
- Cryo Spule, Bruker, Billerica, USA
- Surface-Coil, Bruker, Billerica, USA
- Parafilm „M“ Laboratory Film, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA

- Narkosegerät, Northern Vaporisers, Skipton, GB
- Pulmonalmaske selbstgebaut von der Medizintechnik des Max-Planck-Instituts, Bad Nauheim, DE
- Wasserbad B3, Haake, Dreieich, DE
- Weißes Vaseline, Engelhard Arzneimittel, Niederdorfelden, DE
- MRT - Wiege selbstgebaut von der Medizintechnik des Max-Planck-Instituts, Bad Nauheim, DE
- Respiration Module, SA Instruments Inc., Stony Brook, USA

Vorträge

Postervortrag auf dem virtuellen 93. DGN Kongress 2020 vom 04.11.2020 bis 07.11.2020

Eigene Publikationen

Braun T, Süner L, Hachenberger M, Müller C, Wietelmann A, Juenemann M, Pons-Kühnemann J, Kaps M, Gerriets T, Tschernatsch M, Roth J, Yenigün M. Microbubble-mediated sonothrombolysis with BR38 of a venous full blood thrombus in a rat embolic stroke model. Ann Transl Med. 2021 Jul;9(13):1061.

Die in dieser Dissertation dargestellten Daten sind teilweise schon in oben genanntem Paper publiziert.

Danksagungen

Ich möchte allen von Herzen danken, die mich bei meinem Weg unterstützt haben und diese Promotion erst möglich gemacht haben:

Maaïke Hachenberger - Vielen lieben Dank für die monatelange, geduldige Einarbeitung, für die stundenlangen, hilfreichen und konstruktiven Gespräche und die dreijährige tolle Zusammenarbeit und immerwährende Unterstützung.

Dr. Tobias Braun - Vielen Dank für die umfangreichen Antworten zu all meinen Fragen, die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas und die Unterstützung bei der Durchführung und Ausarbeitung dieser Dissertation.

Dr. Mesut Yeniguen - Vielen Dank für viele tolle Gespräche mit Kaffee und das immer offene Ohr, sowie die Unterstützung bei der Durchführung und Ausarbeitung dieser Promotion und die Möglichkeit einen Teil der „Heart and Brain Research Group“ gewesen zu sein.

Prof Dr. Tibo Gerriets - Vielen Dank für die Betreuung als Doktorvater von Seiten der Klinik für Neurologie in Gießen.

Prof Dr. Joachim Roth - Vielen Dank für die Betreuung als Doktorvaters von Seiten des Instituts für Veterinärphysiologie und –biochemie in Gießen.

Dr. Astrid Wietelmann und Ursula Hofmann - Vielen Dank für die Einarbeitung und Erklärung der MRT und die immerwährende Hilfe bei der Durchführungen meiner Messungen.

Dr. Clemens Müller - Vielen Dank für die unermüdliche Hilfe, wenn das MRT mal wieder nicht funktioniert hat und die fachlichen Gespräche.

Tanja Enders - Vielen Dank für die Einweisungen und Unterstützungen im Tierstall. Mein Dank gilt auch den restlichen Tierpflegern des Max-Planck-Institus für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim.

Dr. Nouha Ritschel - Vielen Dank für die vielen, netten Gespräche.

Edith Loeffler - Vielen Dank für die Unterstützung bei der histologischen Bearbeitung meiner Proben.

Dr. Jörn Pons-Kühnemann - Vielen Dank für die Hilfe bei der Erstellung und Durchführung meiner Statistik.

Und zu guter Letzt meine Familie – Vielen Dank für die Geduld und die Unterstützung in allen Phasen und Bereichen. Danke dass ihr immer für mich da seid.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig 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.

Lebenslauf

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-7041-0



Photo cover (Brain): © peterschreiber.media @ stock.adobe.com

Photo cover (Rat): © Pakhnyushchy @ stock.adobe.com