

**Evaluation der arteriellen Gefäßstrombahn im  
Ischämiemodell der Ratte**

Inauguraldissertation

Anne Marie Barczyk

**Evaluation der arteriellen Gefäßstrombahn im  
Ischämiemodell der Ratte**

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

vorgelegt von Anne Marie Barczyk, geb. Ostendorf  
aus Bocholt

Gießen 2014

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie  
Abteilung für Diagnostische Radiologie  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen  
Leiter: Prof. Dr. med. G. Krombach

Gutachter: Prof. Dr. A. C. Langheinrich

Gutachter: Prof. Dr. M. Kaps

Tag der Disputation: 14.4.2015

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Zerebrale Ischämie</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Ätiologische Einteilung</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Territorialinfarkt.....	1
1.1.2 Grenzzoneninfarkt.....	2
1.1.3 Lakunäre Infarkte.....	2
<b>1.2 Klinische Einteilung</b> .....	<b>3</b>
1.2.2 Reversibles ischämisches neurologisches Defizit (RIND/PRIND).....	4
1.2.3 Vollendeter Insult.....	4
<b>1.3 Pathophysiologische Aspekte</b> .....	<b>5</b>
1.3.1 Zerebraler Blutfluss (CBF).....	5
1.3.2 Penumbrakonzept.....	6
1.3.3 Der Weg zum Zelluntergang - Die postischämische Kaskade.....	7
<b>1.4 Tier- und Ischämie Modelle</b> .....	<b>11</b>
1.4.1 Einsatz von Nagetieren.....	11
1.4.2 Fadenmodell.....	12
1.4.3 Makrosphärenmodell.....	12
<b>2. Vergleichende Anatomie: Gehirn von Mensch und Ratte</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Allgemeine Anatomie</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 Gefäßversorgung</b> .....	<b>13</b>
2.2.1 Extrakranielle Gefäße.....	13
2.2.2 Intrakranielle Gefäße.....	14
<b>3 Bildgebung</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Computertomographie</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2 Magnetresonanztomographie</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3 Mikro- und Nano-Computertomographie</b> .....	<b>18</b>
3.3.2 Grundlagen der Nano-Computertomographie:.....	21
<b>4 Fragestellung und Ziel der Arbeit</b> .....	<b>22</b>
<b>II MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
<b>1 Tiermodelle</b> .....	<b>23</b>
<b>2 Fadenmodell</b> .....	<b>23</b>
<b>3 Makrosphärenmodell</b> .....	<b>24</b>
<b>4 Kontrolltiere</b> .....	<b>24</b>

<b>5 Präparation.....</b>	<b>25</b>
<b>6 Bildgebung.....</b>	<b>25</b>
<b>6.1 Mikro-Computertomographie.....</b>	<b>26</b>
<b>6.2 Nano-Computertomographie.....</b>	<b>26</b>
<b>7 Statistische Analyse.....</b>	<b>27</b>
<b>III ERGEBNISSE.....</b>	<b>28</b>
<b>1 Gefäßdarstellung in der Mikro-Computertomographie.....</b>	<b>28</b>
<b>1.1 Fadenmodell.....</b>	<b>32</b>
<b>1.2 Makrosphärenmodell.....</b>	<b>35</b>
<b>2 Gefäßdarstellung in der Nano-Computertomographie.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1 Fadenmodell.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2 Makrosphärenmodell.....</b>	<b>38</b>
<b>3 Quantitative Bildanalyse.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Vaskuläre Volumina.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Absorption.....</b>	<b>44</b>
<b>IV DISKUSSION.....</b>	<b>46</b>
<b>1 Tiermodelle.....</b>	<b>46</b>
<b>2 Mikro-Computertomographie.....</b>	<b>48</b>
<b>3 Nano-Computertomographie.....</b>	<b>50</b>
<b>4 Limitationen.....</b>	<b>52</b>
<b>V ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>53</b>
<b>1 Deutsch.....</b>	<b>53</b>
<b>2 Englisch.....</b>	<b>54</b>
<b>VI ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>55</b>
<b>1 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>55</b>
<b>2 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>56</b>
<b>VII LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>57</b>
<b>VIII PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>65</b>
<b>IX ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION.....</b>	<b>66</b>
<b>X DANKSAGUNG.....</b>	<b>67</b>
<b>XI LEBENSLAUF.....</b>	<b>68</b>

# I EINLEITUNG

## 1 Zerebrale Ischämie

Ein Schlaganfall zeichnet sich aus durch ein akut einsetzendes fokales oder globales neurologisches Defizit aufgrund einer fokalen oder globalen Durchblutungsstörung im Gehirn. Berichten der WHO zufolge erleiden weltweit jährlich ca. 15 Millionen Menschen einen Schlaganfall, von welchen 5 Millionen versterben und weitere 5 Millionen eine Behinderung davontragen. Nach der koronaren Herzkrankheit (KHK) und malignen Neoplasien ist der Schlaganfall weltweit die dritthäufigste Todesursache. Weiterhin gehören die resultierenden Behinderungen zu den häufigsten Ursachen für Pflegebedürftigkeit im Alter. Somit stellt der Hirninfarkt aktuell eine große medizinische und gesundheitspolitische Herausforderung dar.

Für den ischämischen Schlaganfall wird synonym der Begriff Hirninsult verwendet, während das morphologische Korrelat der Hirnparenchymnekrose, welche sich mittels bildgebender Verfahren darstellen lässt, als Hirninfarkt bezeichnet wird.

Beim Schlaganfall handelt es sich überwiegend (80%) um ischämische Insulte, nur zu 20 % ist eine intrakranielle Blutung mit ihren verschiedenen Ursachen verantwortlich. Hirn- und Sinusvenenthrombosen kommen deutlich seltener vor. Für die Wahl der richtigen Therapie spielt die schnelle diagnostische Zuordnung in eine der beiden Gruppen unverzüglich nach Auftreten des Schlaganfalls eine sehr wichtige Rolle.[52;28]

### 1.1 Ätiologische Einteilung

#### 1.1.1 Territorialinfarkt

Die Ursache eines Hirninfarktes ist seltener die Thrombose eines atherosklerotischen Gehirngefäßes als der embolische Verschluss eines größeren zerebralen Gefäßes. Eine zerebrale Embolie kann kardiogen bedingt sein bei absoluter Arrhythmie bei Vorhofflimmern (45%), Myokardinfarkt (15%), Aneurysmen des linken Ventrikels (10%), rheumatischen Herzklappenerkrankungen (10%) oder künstlichen Herzklappen (10%).[8] Arterioarterielle Embolien können bei arteriosklerotischen Plaques, Dissektionen oder fibromuskulärer Dysplasie von der A. carotis interna, der A. vertebralis oder dem Aortenbogens stammen. Als Folge einer zerebralen Embolie entsteht ein Territorialinfarkt, das häufigste Erscheinungsbild des ischämischen Schlaganfalls: das typische Versorgungsgebiet einer Hirnarterie infarziert mit Beteiligung der Hirnrinde. Die neurologischen Ausfallerscheinungen des Betroffenen richten sich nach der Lokalisation des Infarktes im vorderen Hirnkreislauf (A. carotis interna,

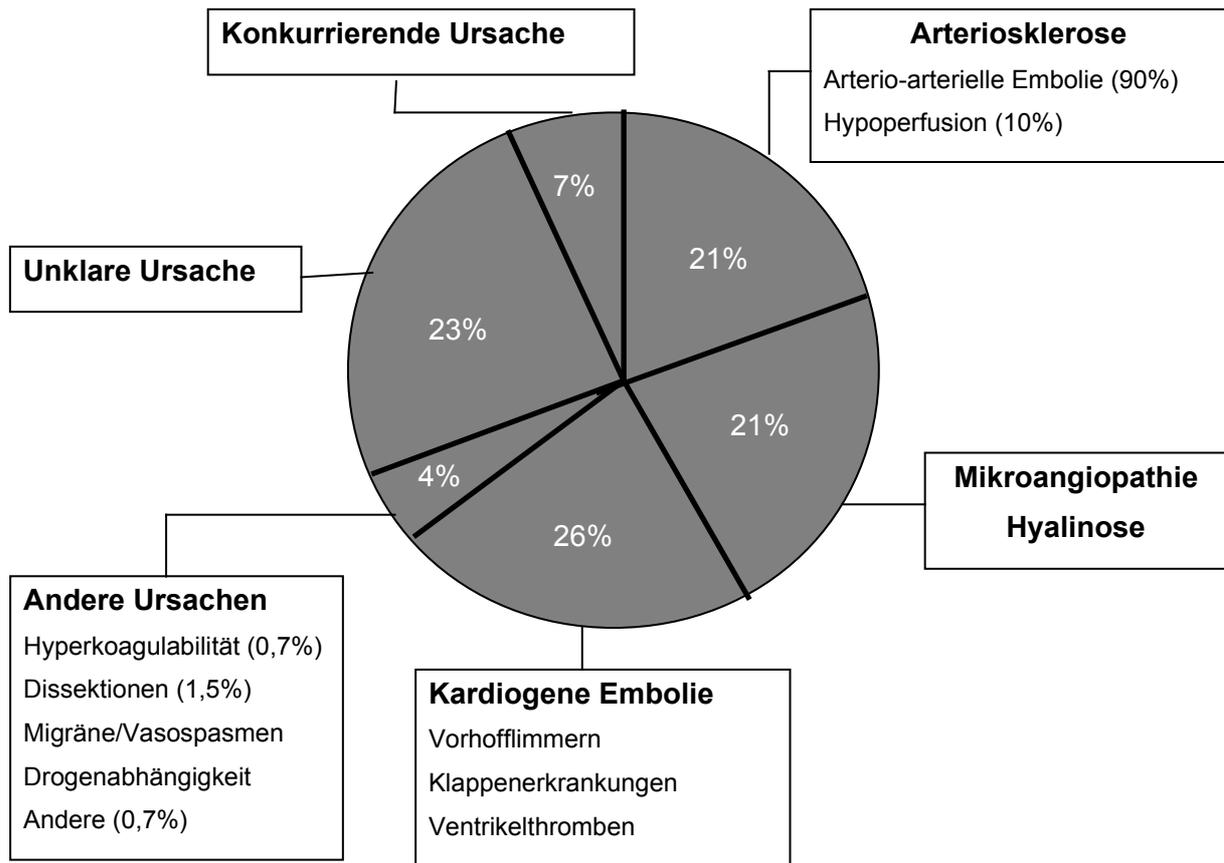
A. cerebri media, A. cerebri anterior) oder hinteren Hirnkreislauf (A. vertebralis, A. basilaris, A. cerebri posterior).[28;98]

### 1.1.2 Grenzzoneninfarkt

Seltener treten hämodynamisch bedingte Infarkte auf, die Grenzzoneninfarkte. Sie entstehen im Grenzgebiet zwischen der A. cerebri posterior und A. cerebri media sowie der A. cerebri media und A. cerebri anterior. Ursächlich für die Hypoperfusion sind vor allem langsam entstandene vorgeschaltete höhergradige Stenosen oder Verschlüsse eines hirnversorgenden Hals- oder Hirngefäßes bei einer insuffizienten Kollateralisierung über den Circulus arteriosus Willisii.[33]

### 1.1.3 Lakunäre Infarkte

Lakunäre Infarkte entstehen durch eine Mikroangiopathie im Gehirn, welche in Form einer Lipohyalinose der kleinen Gefäße als Folge einer chronischen Hypertonie und Diabetes mellitus auftreten kann. Die pathologischen Veränderungen sehr kleiner Gefäße verursachen eine allmähliche Durchblutungsstörung bis hin zum Gefäßverschluss im Bereich der Stammganglien und des Hirnstamms, wo kleine Infarkte von etwa 5-10 mm Durchmesser entstehen. Weiterhin kann es zu einer Degeneration der weißen Hirnsubstanz kommen (subkortikale arteriosklerotische Leukenzephalopathie, SAE), welche eine vaskuläre Demenz zur Folge haben kann.[33;98]



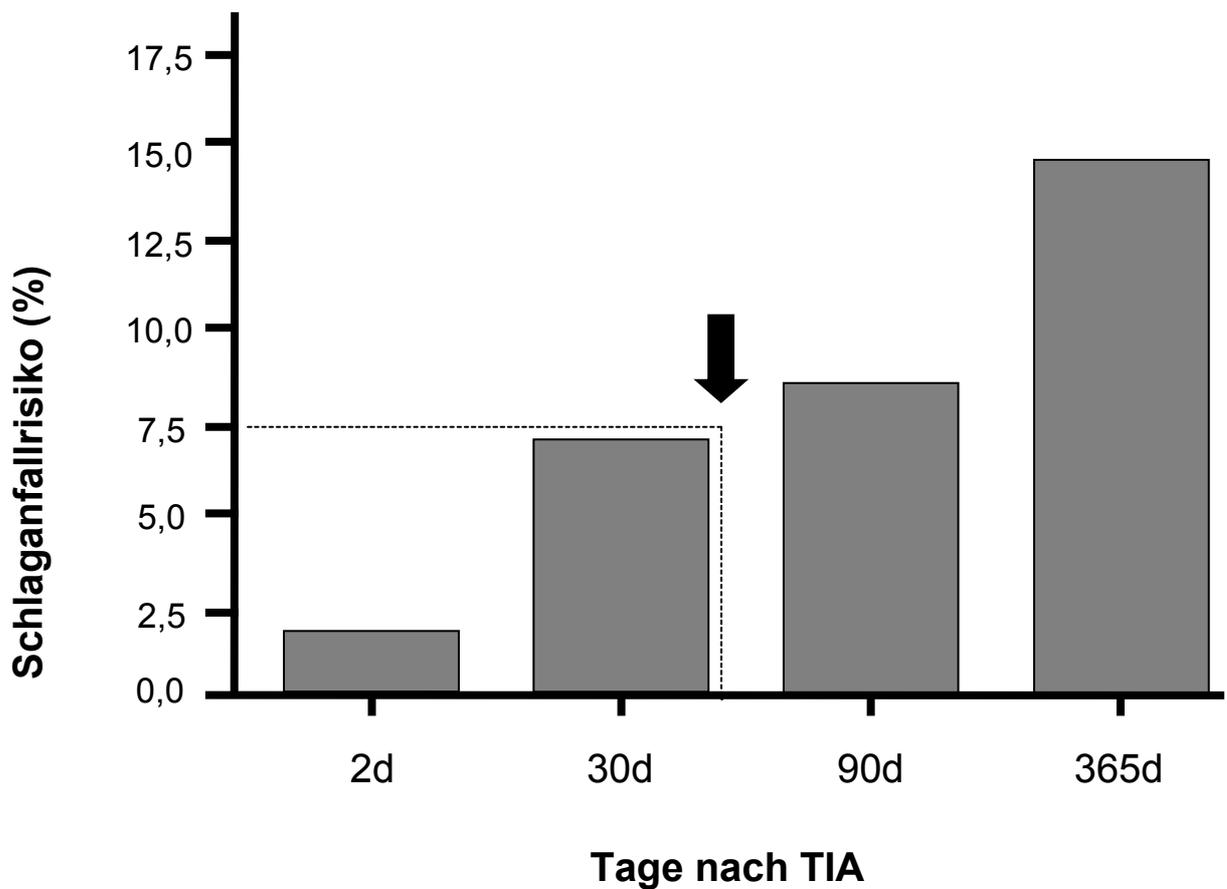
**Abbildung 1:** Pathogenese ischämischer Schlaganfälle in Deutschland - Deutsche Schlaganfall-Datenbank. (Modifiziert nach Eschenfelder et al [28])

## 1.2 Klinische Einteilung

Die Einteilung nach klinischer Verlaufsdynamik stammt noch aus der Zeit, als der Schlaganfall noch eine rein klinische Diagnose war und apparative Hilfsmittel wie der Computertomograph noch nicht zur Verfügung standen. Dennoch findet sie bis heute eine weit verbreitete Verwendung.

### 1.2.1 Transitorisch ischämische Attacke (TIA)

Eine TIA ist definiert als ein flüchtiger ischämischer zerebraler Insult mit vollständiger Rückbildung der neurologischen Defizite innerhalb von 24 Stunden. Jedoch lässt sich trotz einer guten klinischen Entwicklung bei bis zu 70% der Patienten ein Hirninfarkt nachweisen. [20] Auch ist bekannt, dass Patienten nach einer TIA vermehrt Schlaganfälle erleiden. So widerfährt 5 bis 10 % der Patienten bereits im ersten Monat nach einer TIA ein Hirninfarkt mit bleibenden Folgen und bereits innerhalb des ersten Monats ist die Hälfte des Jahres-Rezidiv-Risikos erreicht.[1]



**Abbildung 2:** Schlaganfallrisiko nach TIA. Pfeil: nach 38 Tagen ist die Hälfte des Jahres-Rezidiv-Risikos erreicht. (Nach Hill et al [47])

### 1.2.2 Reversibles ischämisches neurologisches Defizit (RIND/PRIND)

Beim RIND bilden sich die Symptome nach über 24 Stunden komplett zurück, während beim PRIND bei guter Rückbildungstendenz minimale, nicht behindernde Symptome zurückbleiben. Diese Aufteilung wird jedoch uneinheitlich gehandhabt, somit ist hier keine gute Vergleichbarkeit gegeben.[28;4]

### 1.2.3 Vollendeter Insult

Ein vollendeter Hirninfarkt (completed stroke) hinterlässt ein neurologisches Defizit unterschiedlicher Schwere. Des Weiteren kann das Ausmaß der neurologischen Ausfälle bei einem progredienten Schlaganfall noch innerhalb der ersten Stunden oder seltener auch innerhalb von Tagen nach dem akuten Anfall fortschreiten.[28]

## 1.3 Pathophysiologische Aspekte

### 1.3.1 Zerebraler Blutfluss (CBF)

Im Vergleich zu anderen Organen des Körpers hat das Gehirn einen extrem hohen Verbrauch an Sauerstoff und Glukose und reagiert auch außerordentlich empfindlich auf einen Sauerstoffmangel. Wird die Blutzufuhr unterbrochen, fällt im Gehirn der Sauerstoffpartialdruck und der Zell- bzw. Energiestoffwechsel wird beeinträchtigt. Je nach Ausmaß der Ischämie entstehen so reversible oder irreversible Schädigungen der Gehirnstruktur.

Im gesunden Gehirn liegt der zerebrale Blutfluss zwischen 50 und 60 ml Blut/100g/min. Durch die Befähigung der zerebralen Gefäße zur Autoregulation kann er in dem Bereich zwischen 60 und 20 ml Blut/100g/min noch symptomlos schwanken. Die neuronale Funktion versiegt, wenn der Blutfluss unter 20 ml/100g/min absinkt, während die Struktur des Gehirnparenchyms vorerst erhalten bleibt. Erst ein weiterer Abfall des Flusses auf weniger als 8 ml/100g/min hat den Niedergang des Zellstoffwechsels und schließlich die Nekrose zur Folge. Experimentelle Studien liefern Blutflussschwellenwerte für den ischämischen Schlaganfall als Korrelat für funktionelle Beeinträchtigung (Tab.1).

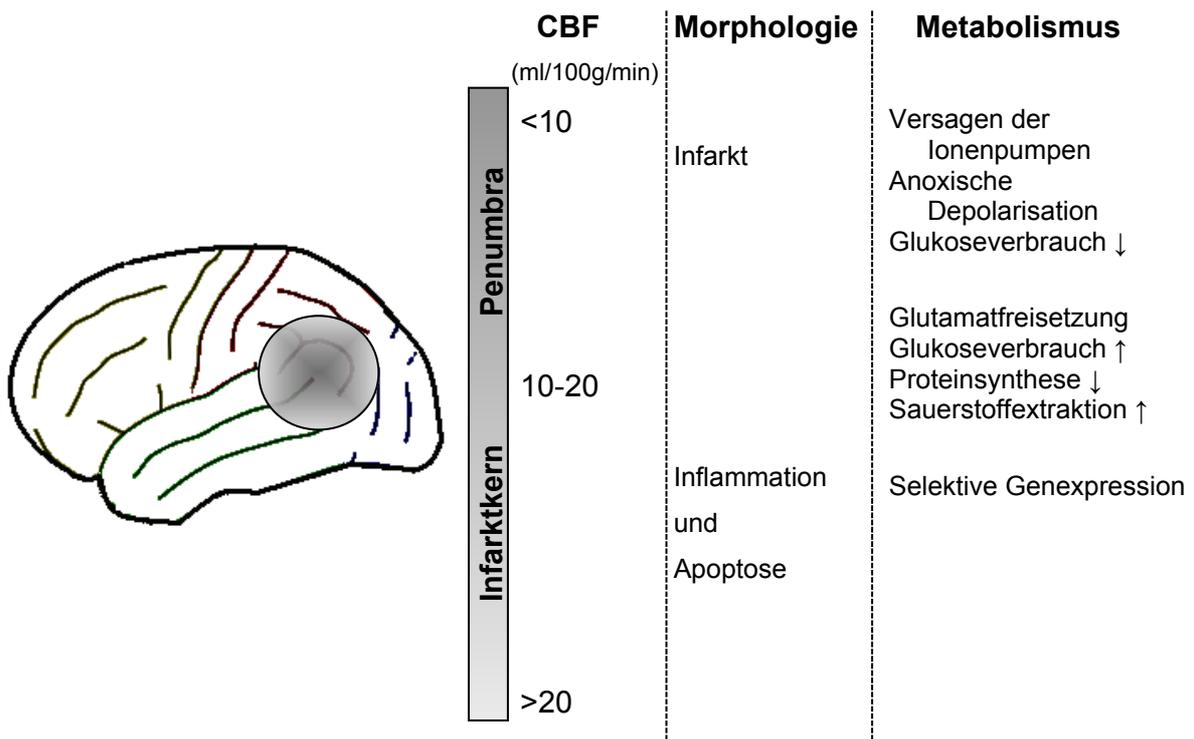
<b>Stoffwechselfvorgang</b>	<b>Blutfluss (ml/100g/min)</b>
Proteinsynthese	55
Anaerobe Glykolyse	35
Freisetzung von Neurotransmittern	20
Störung des Energiemetabolismus	20
Anoxische Depolarisation	15

**Table 1:** *Blutflussschwellenwerte bei zerebraler Ischämie. (Modifiziert nach Eschenfelder et al [28])*

Eine Minderdurchblutung hat ein Hirnödem zur Folge. Hierbei unterscheidet man das zytotoxische vom vasogenen Ödem. Beim zytotoxischen Ödem kommt es bei allen Zellen des Ischämieareals, Nerven-, Glia- und Endothelzellen, zum Hydrops der Zytoplasmen. Durch die ischämische Schädigung der Gefäßendothelien entsteht nach etwa 3 bis 6 h das vasogene Ödem, wobei die tight junctions aufbrechen und Flüssigkeit extravasiert.[28;98]

### 1.3.2 Penumbra-Konzept

Während die Zellen im nicht perfundierten Infarktkern endgültig geschädigt und somit einer Therapie kaum zugänglich sind, bestehen doch im Randbereich des Infarktareals Regionen mit unterschiedlicher Restdurchblutung und Kompensation durch Kollateralisierung seitens benachbarter Hirnarterien. Für dieses so genannte „tissue at risk“, welches als potentiell noch zu rettendes Gewebe über einen begrenzten Zeitraum von 3 bis 6 h noch von einer Reperfusion oder anderen neuroprotektiven Maßnahmen profitieren kann, prägen Astrup et al den Begriff „Penumbra“ (wörtlich: Halbschatten).[3] Tierexperimentell wurde ein Infarktkern mit Blutflusswerten von unter 10 ml/100g/min und einer umgebenden Penumbrazone mit Blutflusswerten unter 20 ml/100g/min, jedoch über 10 ml/100g/min untersucht. Bei rechtzeitiger Reperfusion und Blutflusswerten über 10 ml/100g/min folgt auf die Wiederherstellung des Blutflusses eine Erholung der neurologischen Funktion und ein Rückgang des zytotoxischen Ödems. Bei zu starkem Blutflussabfall unter 10 ml/100g/min oder zu langer Ischämiedauer, sind die Zellen irreversibel geschädigt und eine Reperfusion verschlechtert das vasogene Ödem, wodurch die Blutungsgefahr steigt.[3;44;67;98]

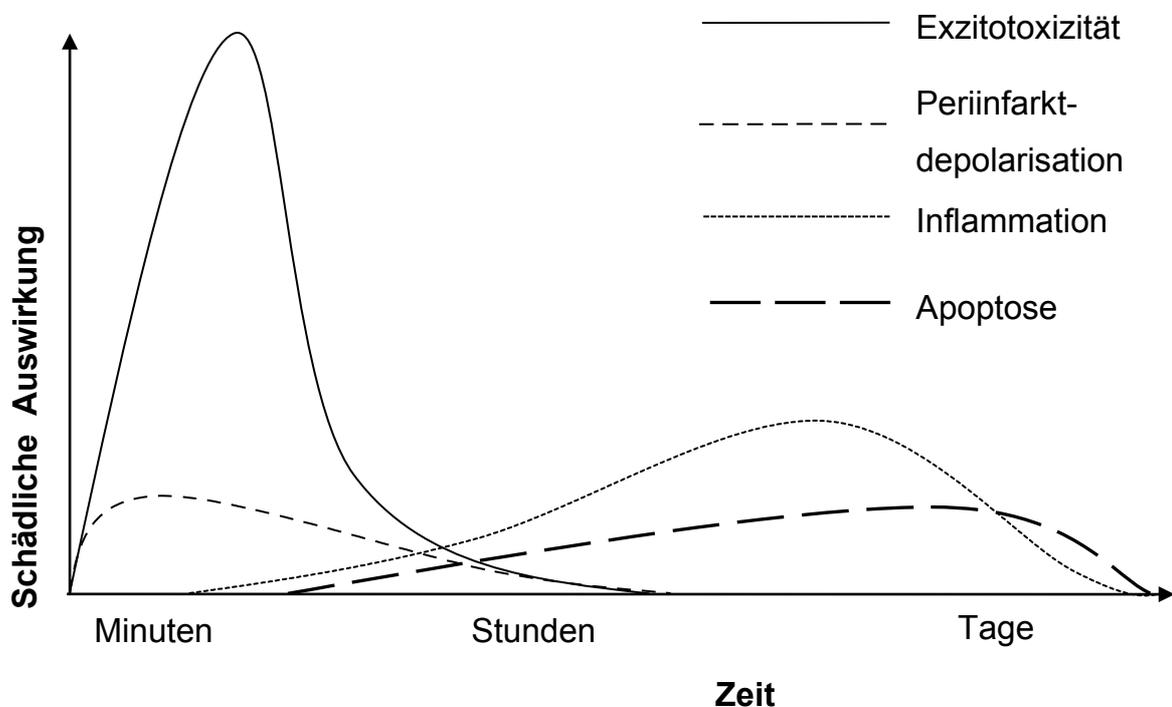


**Abbildung 3:** Penumbra-Konzept. Der Infarktkern, in welchem die Zellen ihr Membranpotential verloren haben, ist umgeben von einer Zone mit einer gewissen verbleibenden Perfusion und intermittierenden Depolarisationen (Periinfarktdepolarisationen), der Penumbra. Von Beginn des Perfusionsdefizits an verhalten sich Infarktkern und Penumbra dynamisch in räumlicher Verteilung und Zeit. (Modifiziert nach Dirnagl et al [23])

### 1.3.3 Der Weg zum Zelltod - Die postischämische Kaskade

Die große Vielfalt der pathophysiologischen Veränderungen, welche auf eine zerebrale Ischämie und zur Parenchymnekrose führen, erschwert es derzeit noch ein einheitliches Konzept für den Ablauf der komplexen metabolischen und molekularen Vorgänge zu erstellen. Die verschiedenen Mechanismen beeinflussen und überschneiden sich netzwerkartig. Oft ist schwierig zu unterscheiden, ob eine Veränderung der Ischämie oder der darauf folgenden Reperfusion zuzuweisen ist.

Das Konzept der vierphasigen Ischämieantwort stammt von Dirnagl et al [25]: Auf eine Minuten andauernde exzitatorische Phase folgt eine Phase der Perinfarktdepolarisation (über Stunden), daran schließt sich über eine Dauer von Tagen die Inflammation an und an letzter Stelle stehen die späten Veränderungen wie Apoptose.



**Abbildung 4:** Zeitlicher Verlauf der postischämischen Schädigungskaskade. (Nach Dirnagl et al [23])

Die erste direkte metabolische Ischämiefolge ist die ATP-Abnahme durch die Unterbrechung der Zufuhr von Sauerstoff und Substraten. Schon die Unterbrechung der Durchblutung von ca. 15 Sekunden führt zu einem vollständigen Verbrauch der ATP-Vorräte im Infarkt kern. Dieser ATP-Mangel ist letztlich maßgeblich für einen Großteil der sich anschließenden metabolischen Störungen.[44]

In der Frühphase der fokalen zerebralen Ischämie spielt die Exzitotoxizität eine maßgebliche Rolle, man spricht auch von der exzitatorischen Phase (s.o.). Aufgrund der verminderten Substratzufuhr führt der Mangel an energiereichen Phosphaten zu einem Versagen der ATP-

abhängigen Ionenpumpen. In Folge dessen depolarisieren die Zellmembranen der Neuronen und Gliazellen und die spannungsabhängigen Kalzium- und Natriumkanäle werden aktiviert. Dies hat wiederum die präsynaptische Freisetzung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat zur Konsequenz. Gleichzeitig kommt es im Bereich der Präsynapse und der Gliazellen durch die Störung der energieabhängigen Wiederaufnahmemechanismen für die exzitatorischen Aminosäuren zu einer zusätzlichen Akkumulierung von v.a. Glutamat.[23] Tierexperimentelle Studien zeigen einen schnellen Anstieg des Glutamatspiegels kurz nach Beginn der Ischämie, welcher dann über die vollständige Dauer der Ischämie erhöht bleibt.[7] Die gesteigerte extrazelluläre Konzentration von Glutamat zieht durch die Aktivierung des NMDA-, AMPA-Rezeptors und spannungsabhängiger Kalziumkanäle einen erhöhten Kalziumeinstrom in die Zellen nach sich.[44] Des Weiteren werden metabotrope Glutamatrezeptoren aktiviert, welche über die Erhöhung von Inositoltriphosphat und Phospholipase-C-Aktivierung die Öffnung intrazellulärer Kalziumreservoirs herbeiführen. Durch diese sich gegenseitig beeinflussenden Vorgänge der Glutamatfreisetzung und Kalziumüberladung entsteht eine hyperexzitatorische Situation, mit einhergehenden sekundären kalziumbedingten Schäden, der Bildung freier Radikale und Änderungen der Genexpression. Die intra- und extrazellulären Elektrolytverschiebungen haben zur Folge, dass Wasser in Richtung des osmotischen Gradienten in den Intrazellularraum gelangt und so zu einer Schwellung der Zellen, dem beginnenden Ödem führt.

Untersuchungen mithilfe von Mikrodialyseverfahren liefern Hinweise, dass eine verstärkte Freisetzung von Glutamat auch bereits oberhalb des Schwellenwertes für den ATP-Mangel stattfindet. Daher erhielt das Glutamat auch seine Bezeichnung als „very early mediator of ischemia“.[44] Zu den durch die Kalziumüberladung bedingten sekundären Schäden gehört die Zerstörung des Zytoskeletts, vorwiegend des Strukturproteins Spektrin und der Mikrotubuli, durch aktivierte kalziumabhängige intrazelluläre Proteasen, die Calpaine. Darüber hinaus ist das erhöhte Kalzium verantwortlich für die Aktivierung von Proteinkinase C und Phospholipase A<sub>2</sub>, eine NO-Synthesesteigerung und DNA-Fragmentierung.[25]

Während unter physiologischen metabolischen Bedingungen nur in geringem Maße freie Radikale gebildet werden, kommt es im postischämischen Verlauf zu einer gesteigerten Freisetzung eben dieser. Hierfür sind verschiedene Prozesse verantwortlich. So entstehen zunächst freie Radikale durch den Abbau von Membranbestandteilen mit anschließendem Arachnoidonsäurestoffwechsel. Überdies bildet sich in den Mitochondrien freier molekularer Sauerstoff, für welchen dort nach Ersatz durch die anaerobe Glykolyse als Elektronenfänger kein Bedarf mehr ist. Beim Abbau von ATP im Xanthinoxidasestoffwechsel entstehen Superoxid und Hydrogenperoxid. Des Weiteren kann aus O<sub>2</sub> in Anwesenheit von NO das aggressive Peroxinitrit entstehen. Ebenfalls eine Masse an freien Radikalen bildet sich bei der Umwandlung von Eisenionen, Fe III zu Fe II, und der Freisetzung von organisch

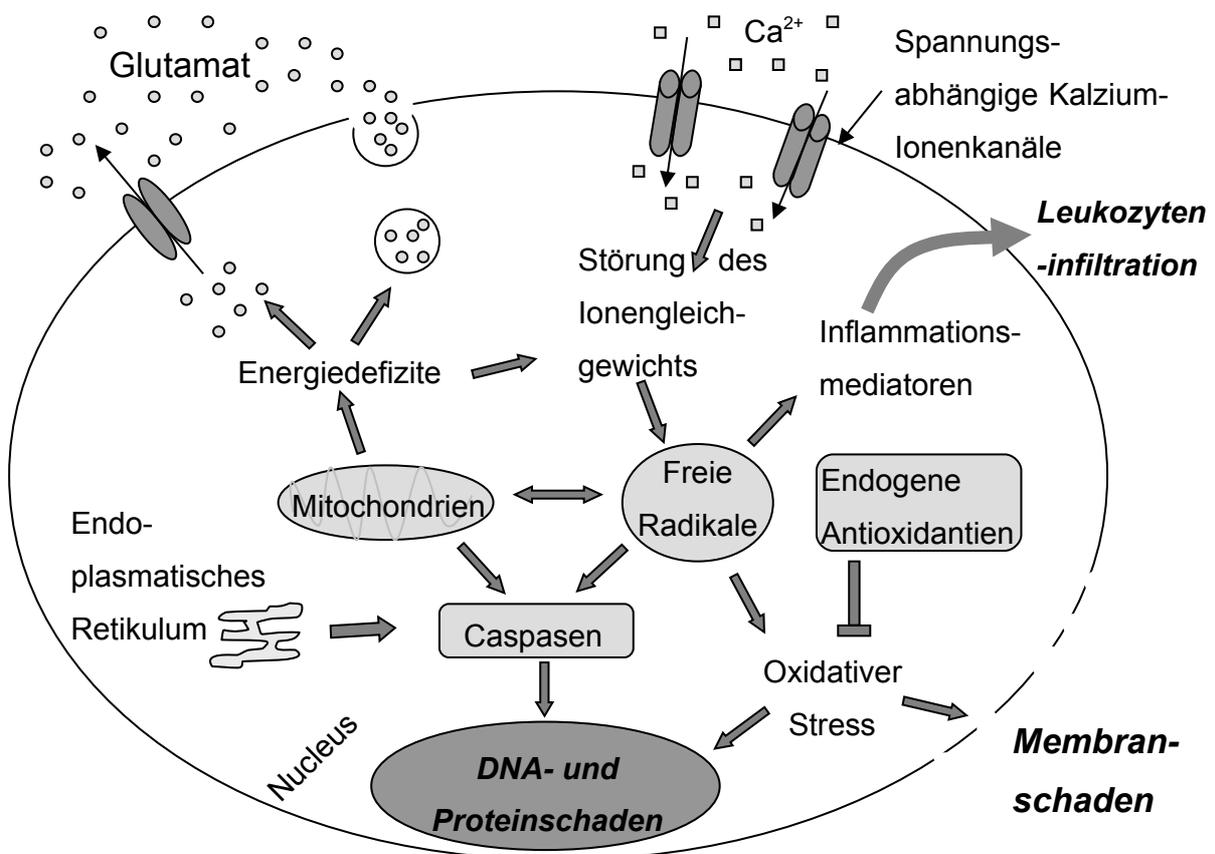
gebundenem Eisen. Zu den schädigenden Auswirkungen der freien Radikale zählen sowohl die Zerstörung von Mitochondrien, Proteinen, Kohlenhydraten und DNA als auch die Lipidperoxidation, welche letztlich in der Auflösung der Zellmembranen enden.[23;44;67]

Unter der Periinfarktdepolarisation versteht man einen Prozess repetitiver Depolarisationen, welche sich ausbreiten und so zur Vergrößerung des Infarktareals führen. Infolge der verminderten Energieversorgung und der vermehrten Kalium- und Glutamatfreisetzung im Rahmen der exzitatorischen Phase depolarisieren die ischämischen Nerven- und Gliazellen, wobei die Zellen im Kern des Ischämiegebietes eine anoxische Depolarisation mit irreversiblen Funktionsverlust durchlaufen, während die Zellen im Bereich der Penumbra dank verbleibender Restperfusion unter weiterem Energieverbrauch repolarisieren.[23] Dabei hängt die Repolarisationsdauer direkt vom Ausmaß der Perfusionsminderung ab. Je ausgeprägter die Perfusionsminderung, desto mehr Zeit brauchen die ischämischen Zellen für die Repolarisation und desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass die transiente Periinfarktdepolarisation in eine anoxische Depolarisation übergeht. Da der vermehrte Energiebedarf zur Regenerierung des Ionengleichgewichts nicht durch einen zunehmenden CBF ausgeglichen werden kann, gelangt die metabolische Kompensationsfähigkeit des Penumbragewebes schnell an ihre Grenzen. Die schwindenden Energiereserven zeigen sich in einer Zunahme der Repolarisationszeiten bei wiederholten Depolarisationen im Periinfarktgebiet mit schlussendlich anoxischer Depolarisation.[87] Bislang konnte dieses Modell der Periinfarktdepolarisation jedoch nur im Tiermodell nachgewiesen werden. Beim Menschen gelang bisher weder elektrophysiologisch noch mithilfe funktionaler Bildgebung der direkte Nachweis, so dass derzeit die Bedeutung der Periinfarktdepolarisation für die Pathophysiologie des menschlichen Schlaganfalls noch unklar bleibt.[23;44]

In der Phase der Inflammation reagiert das Gehirn auf die Ischämie mit einer Entzündungsreaktion, die schon wenige Stunden nach Beginn der Ischämie einsetzt und Tage bis Wochen andauern kann.[2] Eine wichtige Rolle kommt auch hier der Kalziumüberladung der Zellen zu. Die kalziumabhängige Aktivierung intrazellulärer Second-Messenger-Systeme, sowie der Anstieg freier Radikale und auch die Hypoxie an sich initiieren die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene, indem die Synthese von Transkriptionsfaktoren induziert wird. So produzieren die verletzten Zellen Inflammediatoren wie Plättchenaktivierender Faktor (PAF), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$ . Daraufhin wird die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der endothelialen Zelloberfläche induziert. An diese Adhäsionsmoleküle binden komplementäre Oberflächenrezeptoren auf Neutrophilen Granulozyten, welche so die Gefäßwand durchdringen und in das Gehirnparenchym gelangen. Makrophagen und Monozyten folgen den Neutrophilen und migrieren in das ischämische Gewebe. Während die Leukozyten

durch Akkumulation in den kleinen Gefäßen das Ausmaß der Ischämie erhöhen können, leisten auch die Produktion und Freisetzung potentiell toxischer Mediatoren durch eingewanderte Leukozyten und durch Zytokine aktivierte Gliazellen einen wichtigen Beitrag zum ischämischen Zellschaden.[23;42;64]

Die Spätphase des postischämischen Verlaufs ist geprägt von apoptotischen Prozessen, welche den „programmierten Zelltod“ einleiten. Verlieren die Neuronen den synaptischen Kontakt zu ihren Nachbarzellen, so veranlassen die Zellen durch die Aktivierung endogener Proteasen (Caspasen) ihren eigenen Zelltod. Sowohl die Gene für die Caspasen als auch solche, die den Zelltod unterdrücken oder steigern, werden in einem höheren Ausmaß exprimiert und in der frühen wie auch der späten Phase der Ischämie aktiviert. Bei einer apoptotischen Zelle wird der Zellkern aufgelöst und die DNA in ihre spezifischen Bestandteile gespalten, während die Zellmembran vergleichsweise lange intakt bleibt, so dass erst später potentiell toxische Substanzen aus dem Zytoplasma in die Umgebung der apoptotischen Zelle gelangen. Tiermodelle liefern Hinweise darauf, dass im Fall einer zerebralen Ischämie die Apoptose als Zelltod vor allem in der ischämischen Penumbra eine wesentlich bedeutendere Rolle spielt als die Nekrose.[23;66]



**Abbildung 5:** Vereinfachte Übersicht der pathophysiologischen Mechanismen und Wege zum ischämischen Zelltod. (Modifiziert nach Dirnagl et al und Lo et al [23;67])

Der auf eine zerebrale Ischämie folgende Gewebeschaden resultiert letztlich aus der Interaktion der beschriebenen pathophysiologischen Prozesse, welche jeweils potentielle Ziele für eine Therapie darstellen. Durch ein Vorgehen, welches sowohl eine frühe Reperfusion als auch neuroprotektive Therapieansätze miteinbezieht, kann das Ausmaß der Gewebeverletzung eingeschränkt werden.[23] Eine rasche therapeutische Intervention steht im Zentrum der neurologischen Akutbehandlung des ischämischen Schlaganfalls. 2006 führten Saver et al. eine Metaanalyse zur Quantifizierung der durchschnittlichen Größe und Entstehungsgeschwindigkeit eines durchschnittlichen supratentoriellen ischämischen Schlaganfalls durch. Dabei wurde ausgegangen von einer durchschnittlichen Größe von 54 ml (19-100ml) eines Territorialinfarktes, einer durchschnittlichen Entwicklung im Verlauf von 10 Stunden (6-18 Stunden) und einer durchschnittlichen Anzahl von 22 Milliarden Neuronen im Frontalhirn. Dies lässt darauf schließen, dass pro Minute im Schnitt 1,9 Millionen Neurone sterben, 14 Milliarden Synapsen zugrunde gehen und 12 km Nervenfasern zerstört werden. [92] Anhand dieser Zahlen ist leicht ersichtlich, wie groß die Notwendigkeit einer zeitoptimierten Therapie des akuten ischämischen Schlaganfalls ist.

## 1.4 Tier- und Ischämiemodelle

### 1.4.1 Einsatz von Nagetieren

Um die Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls untersuchen und neue Therapieverfahren evaluieren zu können bedarf es zuverlässiger Tiermodelle für fokale zerebrale Ischämien, welche dem menschlichen Schlaganfall entsprechen. Zwar werden auch höher entwickelte Spezies wie Hunde, Katzen oder Primaten für Schlaganfallmodelle eingesetzt, jedoch haben kleine Nagetiere wie die Ratte oder die Wüstenrennmaus (Gerbil) neben der preisgünstigen Anschaffung und Durchführung von Versuchen den weiteren Vorteil, dass sie inzuchtbedingt eine hohe Homogenität innerhalb der einzelnen Stämme aufweisen und ihre zerebrovaskuläre Anatomie und Physiologie eine große Ähnlichkeit mit höher entwickelten Spezies besitzt. Ein weiterer Grund für die Wahl kleiner Nager ist die vorteilhafte geringe Größe des Gehirns für z.B. verschiedene Fixationsverfahren und überdies spielt die größere Akzeptanz gegenüber Spezies wie z.B. den Primaten aus ökologischer und ethischer Perspektive eine gewisse Rolle.[40] Die Modelle mit Maus und Gerbil haben den erheblichen Nachteil, dass diesen Spezies die A. communicans posterior fehlt und so hat sich im vergangenen Jahrzehnt die Ratte zur vorherrschenden Spezies für verschiedene Schlaganfallmodelle etabliert, welche mit unterschiedlichen Techniken die menschliche zerebrale Ischämie simulieren.

### 1.4.2 Fadenmodell

Die am häufigsten angewandte Methode unter den endovaskulären Techniken zum Verschluss der A. cerebri media (MCA) stellt das Fadenmodell dar, welches 1986 von Koizumi et al. eingeführt wurde.[38;39;93] Hierbei wird ein Monofilament anterograd in die A. carotis interna (ICA) eingeführt, bis es den Blutstrom zur A. cerebri media blockiert. Mit dieser Technik erreicht man reproduzierbare Infarkte der MCA und sie erlaubt eine anschließende Reperfusion durch Entfernen des Monofilamentes. Allerdings hat der permanente MCA-Verschluss in dem Fadenmodell einen Nachteil: durch das Einführen des Fadens wird der gesamte Verlauf der ICA okkludiert, einschließlich der A. hypothalamica. Dies führt zu hypothalamischen Infarzierungen und dadurch bedingter schwerer Hyperthermie, welche das Infarktwachstum und die Effekte neuroprotektiver Behandlung beeinflussen können.[36;71] Diese Nebenwirkung kann umgangen werden durch den Einsatz des Fadenmodells zur Induktion transienter Ischämien (Ischämie-Reperfusion), bei welchem der Faden zu einem definierten Zeitpunkt wieder zurückgezogen wird und damit eine Reperfusion ermöglicht wird. Liegt der Zeitraum vom Einführen des Fadens bis zu dessen Entfernung unter 90 Minuten, so kann sich der Hypothalamus vollständig erholen und eine Hyperthermie tritt nicht auf.[39] Komplikationen des Fadenmodells können auftreten durch den unvollständigen Verschluss der MCA (durch eine unzulängliche Einführungstiefe des Fadens) [51;60] oder durch die Induktion subarachnoidaler Blutungen durch Gefäßperforationen.[57;68]

### 1.4.3 Makrosphärenmodell

Um einen permanenten Verschluss der MCA ohne den Effekt der Hypothalamusinfarzierung zu erreichen, wurde das vor kurzer Zeit eingeführte Makrosphären-Modell entwickelt.[35] Bei dieser Methode führt die intra-arterielle Embolisation von kleinen TiO<sub>2</sub>-Kugeln zur selektiven Blockade des Blutflusses zum Hauptstamm der MCA, ohne die A. hypothalamica zu verschließen. Obwohl dieses Modell keine Reperfusion der Gefäße erlaubt, liegt der Vorteil darin, dass hypothalamische Infarzierungen und pathologische Hyperthermie während des permanenten MCA-Verschlusses umgangen werden können.

## 2. Vergleichende Anatomie: Gehirn von Mensch und Ratte

### 2.1 Allgemeine Anatomie

Sowohl der anatomische Aufbau als auch die Physiologie des Rattengehirns gleichen der des menschlichen Gehirns in vielerlei Hinsicht, jedoch sind auch Unterschiede in Gehirnstruktur und -form sowie in der Gefäßanatomie zu erwähnen.

Das Gehirn setzt sich beim Menschen wie bei der Ratte aus zwei Hemisphären zusammen, welche von rostral nach caudal durch die Fissura longitudinalis getrennt und mittig durch das Corpus callosum miteinander verbunden werden. An der Hirnbasis befindet sich der Hypothalamus und bildet den Boden des dritten Ventrikel.[61;62] Das menschliche Gehirn weist infolge der starken Entfaltung des Großhirns und der aufrechten Körperhaltung zwischen Di- und Mesencephalon einen nahezu rechtwinkligen Knick des Truncus encephali aus der Horizontalen in die Vertikale auf und das komplette Rautenhirn wird von beiden Großhirnhemisphären überlagert.[62] Somit unterscheidet es sich von der Form des Rattenhirns, bei welchem der Hirnstamm gestreckt bleibt und die einzelnen Gehirnabschnitte der Schädelbasis noch in annähernd ursprünglicher Art und Weise hintereinander angeordnet aufliegen.[63]

Beim lissencephalen Rattengehirn fehlen die Gyri und Sulci, welche beim gyrencephalen Gehirn des Menschen dem Kortex zur Vergrößerung seiner Oberfläche dienen, dadurch ist die Kortexoberfläche glatt.[64]

## 2.2 Gefäßversorgung

Bei Säugetieren wird das Gehirn hauptsächlich über je zwei Aa. carotides und Aa. vertebrales mit Blut versorgt. Während die Carotiden vornehmlich Blut zum Cerebrum führen, verbinden sich die Vertebralarterien zu einer A. basilaris, welche in erster Linie Cerebellum, Pons und Medulla oblongata speist.[65]

### 2.2.1 Extrakranielle Gefäße

Die A. carotis communis zweigt sich bei Mensch und Ratte auf in die A. carotis interna und die A. carotis externa. Bei der A. carotis interna der Ratte existiert vor deren Eintritt in den Schädel ein abzweigender Ast, die A. pterygopalatina, welche der aus der A. carotis externa abgehenden A. maxillaris des Menschen entspricht.[64] Die menschliche A. carotis interna besitzt keine Äste vor Eintritt in den Canalis caroticus. Während bei der A. carotis externa des Menschen zunächst die A. thyroidea superior, A. lingualis und A. facialis entspringen, bevor sie nach medial die A. pharyngea ascendens und dorsal die A. occipitalis und A. auricularis posterior abgibt und sich dann in die Endäste A. temporalis superficialis und A. maxillaris aufgabelt [62], findet sich bei der Ratte hingegen eine andere Reihenfolge der abgehenden Äste: anfangs entspringen hier der A. carotis externa die A. occipitalis und die A. thyroidea superior und ihre Endäste sind die A. maxillaris externa und die A. lingualis. [64]

### 2.2.2 Intrakranielle Gefäße

Bei Mensch und Ratte formen die zerebralen Gefäße entspringend aus der A. carotis interna und der A. basilaris mit dem Circulus arteriosus Willisii einen Anastomosenkranz um die zentralen Teile der Hirnbasis, durch welchen die Stromgebiete dieser Arterien miteinander verknüpft werden. Innerhalb der jeweiligen Spezies sind anatomische Variationen sehr häufig.[65;66]

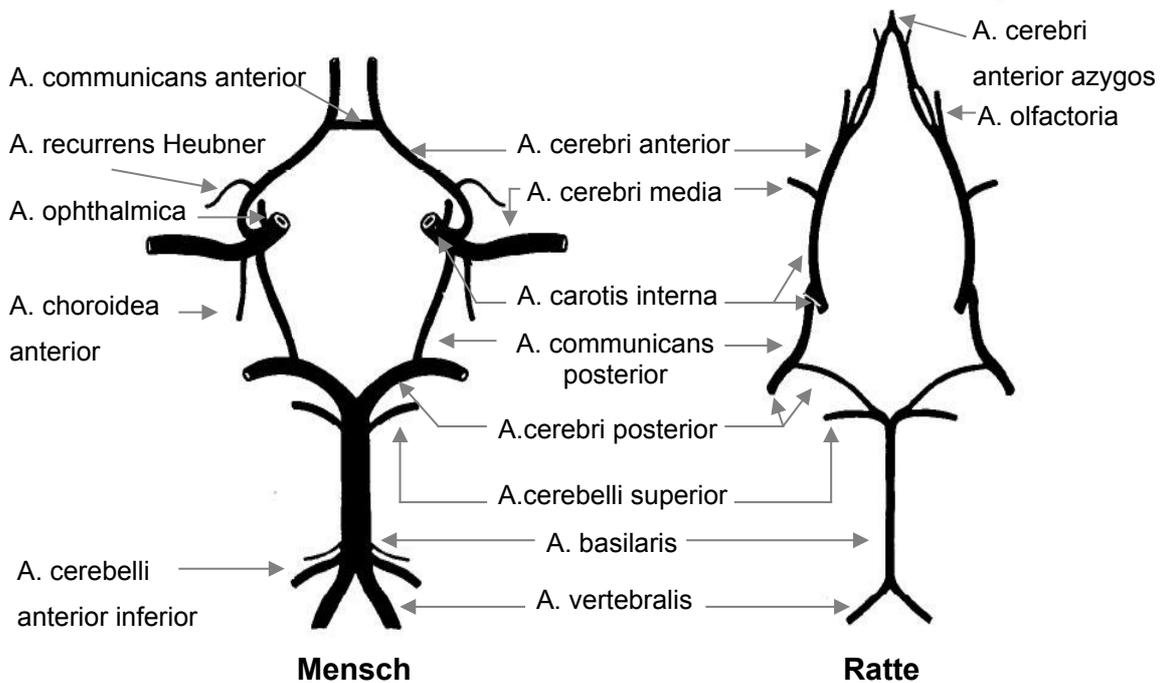
Während der Circulus Willisii beim Menschen hauptsächlich durch die Aa. cerebri anteriores, die Aa. communicantes posteriores und Aa. cerebri posteriores gebildet wird, werden bei der Ratte die Aa. carotis internae zu einem wesentlichen Bestandteil des Circulus, bevor sie sich in je eine A. cerebri anterior und A. cerebri media aufteilen.[65] Die menschliche A. carotis interna gelangt durch den Karotiskanal in den Schädel und vor der Aufzweigung in A. cerebri anterior und A. cerebri media entspringt ihr lateral des Chiasma opticum die A. ophthalmica. Bei der Ratte findet sich kein Gefäß, welches der A. ophthalmica im Menschen entspricht [67], stattdessen handelt es sich bei der A. ophthalmica der Ratte um einen Ast der A. pterygopalatina.[65] Während beim Menschen die beiden Aa. cerebri anteriores getrennt nach rostral ziehen und durch die A. communicans anterior verbunden sind, vereinigen sich die beiden Aa. cerebri anteriores bei der Ratte zu einem einzigen Gefäßstrang und die A. communicans anterior fehlt. Vor der Vereinigung entspringt den Aa. cerebri anteriores jeweils eine A. olfactoria, welche beim Menschen als Gefäßanlage nur im Embryo-Stadium erkennbar ist.[68]

Die A. cerebri media ist sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte der kräftigste Ast der A. carotis interna und versorgt den größten Teil der lateralen Oberfläche des Gehirns. Sowohl mit der A. cerebri anterior als auch mit der A. cerebri posterior bildet sie umfangreiche Anastomosen.

Einen wichtigen anastomotischen Shunt zwischen der A. carotis interna und dem vertebro-basilären Stromgebiet stellt die A. communicans posterior dar. Sie entspringt der A. carotis interna und verbindet sich als lateraler Anteil des Circulus Willisii mit der A. cerebri posterior. [66] Beim Menschen tritt sie als der am meisten variierende Abschnitt des Circulus Willisii mit häufig asymmetrischem Ursprung, Durchmesser oder Verzweigung auf, wohingegen bei der Ratte beide Aa. communicantes posteriores meist weniger variabel mit sich in etwa entsprechenden Durchmessern sind.[68] Um die A. cerebri posterior der Ratte bestand hinsichtlich der Namensgebung dieses Gefäßes in der Vergangenheit eine gewisse Verwirrung in der Literatur, vor allem wegen der deutlichen Unterschiede in Größe und Verzweigungsmuster dieser Arterie im Vergleich zum Menschen. Den Untersuchungen von Moffat (1961) zufolge besteht die A. cerebri posterior der Ratte aus zwei Anteilen. Der eine ist ein Gefäßsegment kleineren Durchmessers, welches die A. basilaris mit der A. communicans posterior verbindet. An die Junktion mit der A. communicans posterior schließt

sich das zweite Gefäßsegment der A. cerebri posterior an, dessen Durchmesser dem der A. communicans posterior entspricht, so dass es wie eine Fortführung eben dieser erscheint. Überwiegend unterliegen Ursprung und Verlauf der Aa. cerebri posteriores einem deutlichen Grad an Asymmetrie.[69] Unter den Kleinhirnarterien ist die A. cerebelli superior diejenige von größter Konstanz, sie entspringt der A. basilaris sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte dicht vor deren Aufzweigung in die Aa. cerebri posteriores. Die Ursprünge von A. cerebri posterior und A. cerebelli superior greifen häufig ineinander über.[65] Im Gegensatz zur menschlichen A. basilaris, welche häufig deutlich zu einer Seite des Pons verlagert ist, verläuft die Basilararterie bei der Ratte zumeist vergleichsweise geradlinig.[64] Die Aa. vertebrales entspringen bei Mensch und Ratte der A. subclavia und haben beim Menschen meist unterschiedliche Größen, so dass eine Vertebralarterie die andere in der Größe bis um das Dreifache übertreffen kann.[66] Bei der Ratte sind die beiden Arterien überwiegend gleich groß.[65]

Ein elementarer Unterschied besteht zwischen Mensch und Ratte hinsichtlich der arteriellen Gefäßversorgung des Hypothalamus. Der menschliche Hypothalamus wird hauptsächlich über kleine, von der A. cerebri anterior abzweigende Äste und zusätzlich über mehrere kleine abzweigende Gefäße des intrakraniellen Teils der A. carotis interna und der A. communicans posterior bzw. anterior ernährt.[70] Hingegen existiert bei der Ratte eine A. hypothalamica, welche aus der A. carotis interna entstammt und den Hypothalamus überwiegend versorgt. Ergänzend erhält dieser Blut über jeweils einen kleinen Ast aus der A. cerebri media und A. communicans posterior.[64] Dieser Umstand stellt bei der Anwendung des beschriebenen Fadenmodells zur fokalen zerebralen Ischämie der Ratte einen komplizierenden Faktor dar, da durch das Einführen des Fadens in die A. carotis interna die A. hypothalamica verlegt wird und somit unerwünschte Hypothalamusinfarkte induziert werden.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der bedeutenden zerebralen Arterien bei Mensch und Ratte. (Modifiziert nach Lee et al.[65])

### 3 Bildgebung

Wegen ihrer Häufigkeit unter den zerebrovaskulären Erkrankungen bedarf die akute zerebrale Ischämie einer eindeutigen und zuverlässigen Diagnostik. Der verlässliche Nachweis und die Visualisierung einer zerebralen Ischämie und vor allem die zugrunde liegende Gefäßpathologie stellen immer noch eine große Herausforderung an die Gefäßforschung dar. Heute werden zur Diagnostik verschiedene nicht-invasive bildgebende Verfahren eingesetzt. Zu den wichtigsten gehören die Computertomographie mit der CT-Angiographie und der CT-Perfusion, und die Magnetresonanztomographie mit MR-Angiographie und Perfusions-MRT.

Beim diagnostischen Vorgehen im Falle eines akuten ischämischen Insults muss die Bildgebung entscheidende Fragen beantworten, welche ausschlaggebend sind für das folgende therapeutische Konzept:

- Liegt ein akuter Gefäßverschluss vor, der einer Lyse oder einem endovaskulären Eingriff zugänglich wäre?
- Besteht eine akute intrakranielle Blutung?
- Ist bereits nekrotisches Gewebe sichtbar?

Beantworten lassen sich diese Fragen mittels ihrer verschiedenen Techniken sowohl mit Hilfe von MRT- als auch CT-Verfahren.

### 3.1 Computertomographie

Die Computertomographie als ein klinisches Röntgenverfahren zur Erstellung von Transversaltomogrammen mit einer hohen Kontrastauflösung hat sich in den vergangenen Jahren von der Einzelschicht-Spiral-CT über Mehrschicht-Spiral-CT bis hin zu den neuesten Dual-Source-CTs mit einer Ortsauflösung von isotropen Voxeln von 0,6 x 0,6 x 0,6 mm [71] immer weiter entwickelt. Erst Mitte der 1990er wurde sie ein Standard-Verfahren in der Diagnostik des akuten Schlaganfalls, als die NINDS-Studie (National Institute of Neurological Disorders and Stroke) die Sicherheit und Wirksamkeit innerhalb von 3 Stunden nach einem ischämischen Anfall intravenös verabreichtem Gewebefibrinolyseaktivator zeigen konnte, wenn mittels Computertomographie eine Blutung ausgeschlossen wurde [72]. Neben dem Ausschluss einer Blutung dient die Computertomographie auch der Entdeckung früher Infarktzeichen. Da ein linearer Zusammenhang zwischen der Photonenabsorption und dem spezifischen Gewicht des Gehirngewebes besteht, kommt es bei einer Wasserzunahme von 1% im Gewebe zu einer Dichteminderung um etwa 2,5 Hounsfield Units (HU).[73] Durch das frühe Infarktödem kommt es daher schon ab etwa 2 Stunden zu einer linearen Dichteminderung. Hierbei korreliert die Hypodensität gut mit dem irreversibel geschädigten Infarktareal.[74;75] Im zeitlichen Verlauf verstärkt sich die Hypodensität und erlangt nach ungefähr 6 Tagen, am Höhepunkt des vasogenen Ödems, ihr Maximum. Die Entdeckung der frühen hypodensen Veränderungen in der CT-Bildgebung bedarf jedoch einiger Erfahrung und gelingt nicht immer. Dennoch ist eine CT-Untersuchung für die Erstdiagnose eines Hirninfarkts ausreichend um eine intrazerebrale Blutung auszuschließen und die Therapie einleiten zu können. Die Angio-CT dient dem Nachweis oder Ausschluss eines größeren Gefäßverschlusses, dabei sind Äste bis zu dritter Ordnung beurteilbar.[76] Mittels der dynamischen Perfusions-CT kann der Blutfluss auf Gewebeebene ermittelt und so eine Minderdurchblutung nachgewiesen werden. Nutzt man beim akuten Schlaganfall sowohl Nativ-CT als auch Angio-CT und Perfusions-CT in Kombination, so spricht man von multimodaler CT; diese dauert einschließlich Auswertung durchschnittlich 12 min.[77]

### 3.2 Magnetresonanztomographie

Da die MRT der CT bei der Diagnostik des ischämischen Schlaganfalls in einiger Hinsicht überlegen ist, hat sich ihre Rolle durch zunehmend routinemäßige Anwendbarkeit deutlich verändert und sie wird zunehmend zur primären Bildgebung eingesetzt. Der Nachweis einer akuten Blutung ist mittels MRT ebenso gut, der Nachweis einer chronischen Blutung sogar besser möglich als mit der CT. Auf T2-gewichteten Aufnahmen kann bereits 2-3 Stunden nach dem klinischen Ereignis eine Zunahme der Signalintensität festgestellt werden. Anhand von diffusionsgewichteter Bildgebung lässt sich bereits nach 30 Minuten das Infarktgebiet

detektieren. Da die Perfusions-MRT sensibel für minderperfundiertes, aber noch nicht irreversibel geschädigtes Gewebe (Penumbra) ist, wird sie zunehmend in Kombination mit der diffusionsgewichteten Bildgebung eingesetzt um potentiell noch zu erhaltendes Gehirngewebe darzustellen.[78] Weiterhin ist die Sensitivität der MRT für Insulte im Bereich der hinteren Schädelgrube deutlich höher und sie zeigt besser als die CT kleine petechiale Einblutungen im Bereich des Infarktes. Die Anfertigung einer MR-Angiographie kann in einer Sitzung mit der MRT-Untersuchung stattfinden. Bei gleicher Verfügbarkeit kann also die MRT der CT vorgezogen werden, jedoch darf zu Gunsten einer MRT keine relevante zeitliche Verzögerung der Diagnostik in Kauf genommen werden.

Die MRT ist bis heute sowohl im klinischen [79;80] als auch im experimentellen Bereich [81;82] der Forschung die am häufigsten verwandte Methode zur Untersuchung der zerebralen Perfusion und Gefäßveränderungen bei zerebraler Ischämie. Eine große Einschränkung bei der Anwendung der MRT ist jedoch die nötige räumliche Auflösung um Veränderungen in der Mikrovaskulatur visualisieren und quantifizieren zu können.

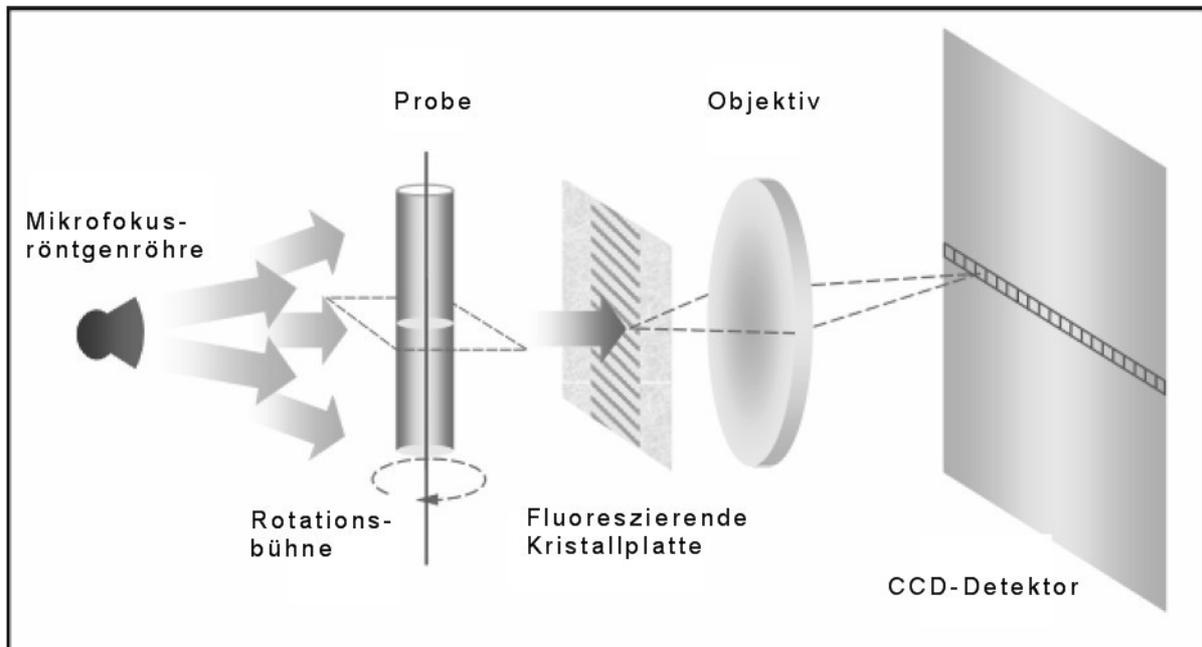
### 3.3 Mikro- und Nano-Computertomographie

#### 3.3.1 Grundlagen der Mikro-Computertomographie

Zu Beginn der Achtziger Jahre kamen die ersten Mikro-Computertomographen zur Anwendung, welche Röntgenstrahlen aus modifizierten Mikrofokusröntgenröhren emittierten. [83-85] Mithilfe der von Feldkamp 1989 entwickelten Rekonstruktionsalgorithmen konnte eine Ortsauflösung mit isotropen Voxelgrößen von 30-50  $\mu\text{m}$  erreicht werden.[86] Im weiteren Verlauf der Entwicklung sind Computertomographen mit Auflösungsweiten von bis zu 10-15  $\mu\text{m}$  entstanden, wobei die wachsenden technischen Möglichkeiten der Bildaufnahme und -bearbeitung, der Datenspeicherung und Prozessorgeschwindigkeiten erstmals die Betrachtung der dreidimensionalen Komplexität und intakten Kontinuität einer Struktur erlaubten.[87-89]

Ein Mikro-CT-Scanner besteht grundsätzlich aus folgenden Elementen: einer Strahlenquelle, einem Probeschlitzen und einer CCD-Detektorkamera (Charged-Coupled-Device) mit angeschlossenen Computerarbeitsplätzen. Die Röntgenröhre und der Detektor drehen sich nicht wie bei den im klinischen Alltag am Patienten eingesetzten Computertomographen um das Objekt, sondern das Objekt rotiert in einem fixen Strahlengang auf dem Probeschlitzen. Als Strahlenquelle dienen dem Mikrocomputertomographen Fein- und Mikrotubusröntgenröhren mit sehr kleinen Fokusgrößen (5-30  $\mu\text{m}$ ). Eine Reduktion der Fokusgrößen wird durch den Einsatz von Transmissions- oder Reflektionsanoden erreicht. So kann im Vergleich zum klinischen CT-Scanner eine Erhöhung der Ortsauflösung um 1 bis 2 Größenordnungen erzielt werden (von 1-0,5 mm auf 5-50  $\mu\text{m}$ ). Alternativ kommen außerdem hochenergetische Synchrotronstrahlungsquellen zum Einsatz.[90]

Die Wahl der Strahlenquelle bestimmt die Geometrie des Mikro-CT-Scanners: Mit den Mikrotubusröntgenröhren wird die Fächerstrahl- oder Kegelstrahlgeometrie genutzt, wobei für die maximal zu erzielende Auflösung die Fokusgröße der Röntgenröhre entscheidend ist. Dagegen ergibt sich bei der Synchrotronstrahlung eine Parallelstrahlgeometrie; für die maximal erreichbare Auflösung ausschlaggebend ist hierbei das Auflösungsvermögen des Detektors.[91]



**Abbildung 7:** Schema-Darstellung der Mikro-CT-Technik mit Kegelstrahlgeometrie. (E.L. Ritman, Department of Physiology and Biomedical Engineering, Mayo Clinic, Rochester, USA)

Fein- oder Mikrofokusröhren verwenden üblicherweise Stromstärken von 4-100  $\mu\text{A}$ , Spannungen um 10-150 kV und Fokusgrößen von 5-30 $\mu\text{m}$ . Die Leistung der Röhren legt fest, wie viele Quanten in einem bestimmten Zeitintervall pro Fläche (Intensität) zur Verfügung stehen. Um eine höhere Bildauflösung zu erreichen, wird sowohl eine Erhöhung der Intensität als auch eine möglichst niedrige Fokusgröße benötigt, welche jedoch eine Verringerung der Röhrenleistung mit sich zieht. Somit kann keine gleichzeitige Intensitätserhöhung und Verminderung der Fokusgröße stattfinden. Um dennoch eine hohe Bildauflösung zu erreichen verwendet das Mikro-CT-Verfahren möglichst kleine Probendurchmesser und im Vergleich zum klinischen CT deutlich längere Messzeiten von Minuten bis Stunden.[92] Die geringe Probengröße beim Mikro-CT-Verfahren ergibt sich nicht nur aus der geringen Röhrenleistung sondern ist auch durch den Umfang der entstehenden Datensätze bedingt. Je nach Größe der Bildpunkte können die Volumendatensätze sehr groß werden (z.B. ergibt sich für einen Volumensatz mit 1024<sup>3</sup> eine Größe von 2150 MB), was die Technik hinsichtlich Speicherung und Visualisierung bisher noch vor ein ungelöstes Problem stellt.[93]

Das zu scannende Objekt wird auf einem Probeschlitten befestigt und kann auf dessen drehbarer Achse in frei definierbaren Winkelschritten rotieren. Da der Schlitten auf einer Längsachse zwischen Strahlenquelle und Detektor frei beweglich ist, lässt sich durch Veränderung des Abstands zwischen Objekt und Detektor der Vergrößerungsmaßstab zwischen 1:1 und 20:1 variieren. Indem das Objekt vom Detektor in Richtung Strahlenquelle verschoben wird kann die Ortsauflösung erhöht bzw. erhalten werden, ohne dass jedoch die minimale Fokusgröße unterschritten werden darf. Jenseits der technischen Begrenzung von minimal 8  $\mu\text{m}$  Fokusgröße kann also die Probe nicht näher an die Strahlenquelle herangeschoben werden um eine weitere geometrische Vergrößerung zu erzielen.

Bei dem Bilddetektor handelt es sich um eine elektronisch gekühlte 12-bit-CCD-Kamera mit einer 25  $\mu\text{m}$  durchmessenden hochauflösenden Szintillatorschicht aus Caesiumiodid und Thallium [CsI(Tl)], die einem faseroptischen Sensor aufliegt. Durch die Kühlung wird ein Ansteigen des Dunkelstroms verhindert und dadurch eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erreicht.[94] Dies spielt vor allem bei längeren Messzeiten eine Rolle. Ein digitaler Frame-Grabber ist mit der Kamera verbunden und zur Bildvisualisierung an PC-Systeme angeschlossen. Die emittierten Röntgenstrahlen treffen nach Durchleuchten der Probe auf die Szintillatorschicht und werden dort in Lichtsignale umgewandelt, welche über faseroptische Systeme an die Oberfläche der Kamera übertragen werden. Mithilfe des Frame-Grabbers werden die analogen Lichtsignale in digitale Signale umgewandelt und als Absorptionbilder an die angeschlossenen Arbeitsstationen gesendet. Dort werden die Rohdaten anhand des Feldkamp-Algorithmus mittels der Rückprojektionstechnik in axiale Schnittbilder umgewandelt.[95] Diese axialen Einzelschichtbilder bestehen aus isotropen Voxeln und haben eine Größe von ca. 1 MB; aus ihnen entsteht die Rekonstruktion des kompletten dreidimensionalen Objektes. Die Grauwertverteilung des minimalen und maximalen Grauwertes jedes einzelnen Schnittbildes werden optimiert, bevor die Schnittbilder der gesamten Probe seriell rekonstruiert werden können. Zur Auswertung und Visualisierung einer Probe und um all deren Parameter genau zu quantifizieren und zu qualifizieren, bedient man sich eines Bildanalyseprogramms, z.B. ANALYZE (Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN, USA).

	<b>Ganzkörper-Spiral-CT</b>	<b>Mikro-CT</b>
<b>Geometrie</b>	Fächerstrahl (Detektor u. Röhre rotieren)	Fächer- oder Kegelstrahl (Objekt rotiert)
<b>Maximale Ortsauflösung</b>		
in der Schicht	0,25 – 1,0 mm	5 – 50 µm
Schichtdicke	0,50 -2,0 mm	5 – 50 µm
<b>Röhre</b>	Hochleistungs-CT-Röhre	Fein- oder Mikrofokusröhre
Strom	10 – 500 mA	40 – 100 µA
Spannung	80 – 140 kV	10 – 150 kV
Fokusgröße	0,7 – 1,5 mm	5 – 30 µm
<b>Detektor</b>	Zeilendetektor	Zeilen- oder Flächendetektor
<b>Objektdurchmesser</b>	5-50 cm	< 5 cm
<b>Matrixgröße</b>	512 <sup>2</sup>	512 <sup>3</sup> - 1024 <sup>3</sup>
<b>Speicherbedarf</b>	0,5 MB/Bild (16 bit) 160 MB/Datensatz	0,5 – 2,1 MB/Schicht (16 bit) 270 – 2150 MB/Datensatz
<b>Volumenscanzeiten</b>	20 – 40 s (Thorax)	Minuten bis Stunden

**Tabelle 2:** Vergleich charakteristischer Parameter von Mikro-CT-Geräten und klinischen Spiral-CT-Scannern. (Modifiziert nach Engelke et al.[96])

### 3.3.2 Grundlagen der Nano-Computertomographie:

Die Nano-Computertomographie stellt eine in jüngster Zeit entwickelte Möglichkeit zur zerstörungsfreien Mikrostrukturanalyse und dreidimensionalen Darstellung komplexer innerer Strukturen dar. Bisher waren Auflösungen im Submikrometerbereich der vergleichsweise aufwendigen und kostenintensiven Synchrotrontechnik vorbehalten. Mit der Entwicklung so genannter Nanofokusröntgenröhren können mittlerweile Ortsauflösungen bis zu 120 nm isotroper Voxelgröße erreicht werden.[97] Diese Nanofokusröntgenröhren stellen Strahlenquellen vom offenen Röhrentyp dar, bei welcher der Brennfleck einer Mikrofokusröhre durch ein mehrstufiges Linsen- und Blendensystem bis auf Größen von einigen Mikrometern weiter verkleinert wird. Bisher findet die Nano-Computertomographie lediglich eine begrenzte Anwendung in der bio-medizinischen Forschung. Auch in anderen Forschungsgebieten kommt sie aufgrund der erst kürzlich eingeführten Technologie und der noch mäßigen Zahl an Anbietern von Nano-CT-Geräten weltweit bisher wenig zum Einsatz.

Einsatzgebiete von Nano-CT-Geräten sind beispielsweise die Materialwissenschaften [97] oder die Elektronikindustrie [98]. Die belgische Firma SkyScan führte im Jahr 2005 den weltweit ersten Labor-tauglichen Nano-Computertomographen ein.

Der Aufbau und die Funktion eines Nano-Computertomographen entsprechen im Wesentlichen denen eines Mikro-Computertomographen mit den Komponenten Strahlenquelle, Probeschlitten und CCD-Detektorkamera. Den wesentlichen Unterschied stellt der Aufbau der Röntgenröhre dar, welcher die im Vergleich zur Mikro-CT deutlich höhere Ortsauflösung ermöglicht. Die offene Röntgenröhre benötigt einen kontinuierlichen Abtransport von Luft, welcher durch spezielle Vakuumpumpen sichergestellt wird. Der von der Kathode emittierte Elektronenstrahl wird durch zwei elektromagnetische Linsen (Kondensorlinse und Objektivlinse) auf die Oberfläche eines Röntgen-Targets fokussiert. Das Target weist an der Oberfläche seines Berylliumfensters einen dünnen Wolframfilm auf, auf welchen der Elektronenstrahl auftrifft, wodurch Röntgenemission entsteht. Die Röntgenstrahlen passieren das Berylliumfenster, welches das Vakuum von Luft trennt, und treffen nach Durchstrahlen des Objektes auf den Röntgendetektor. Dort findet wie bereits im vorangehenden Kapitel beschrieben die Umwandlung der auftreffenden Röntgenstrahlen in zunächst Lichtsignale und folgend in digitale Signale statt, welche als Absorptionsbilder an die angeschlossenen Arbeitsstationen gesendet werden. Ein Bildanalyseprogramm (Analyze®) dient anschließend der Darstellung und qualitativen bzw. quantitativen Auswertung der Probe.

## **4 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluierung der radiographischen Charakterisierung und die quantitative Erfassung von zerebralen Gefäßalterationen in zwei erprobten Ischämie-Modellen der Ratte durch hochauflösende radiologische Verfahren wie die Mikro- und Nano-Computertomographie. Im Vordergrund steht hierbei die Frage nach der technischen Durchführbarkeit der Mikro- und Nano-Computertomographie zur Detektion und Differenzierung der strukturellen und funktionalen vaskulären Veränderungen.

## **II MATERIAL UND METHODEN**

### **1 Tiermodelle**

Die Tierversuche werden nach Genehmigung des Versuchsvorhabens nach § 8 Abs. 2 des Tierschutzgesetzes (BGBl.I S. 1105, Mai 1998) durchgeführt. Über die Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen) werden die männlichen Sprague-Dawley Ratten im Alter von 8 bis 9 Wochen und mit einem Gewicht zwischen 300 und 350g bezogen. In Gruppen zu jeweils fünf Tieren werden die Tiere in Makrolonkäfigen vom Typ IV gehalten und erhalten sowohl Wasser als auch ein Alleinfuttermittel (Altromin®) zur freien Aufnahme.

Vor der jeweiligen Operation erfolgt die Narkoseeinleitung über 2 Minuten mit 5% Isofluran (Forene®) in 3,0 l/min Luft. Anschließend wird während der Operation bei erhaltener Spontanatmung die Betäubung bedarfsgesteuert mit 2% bis 3% Isofluran (0,5 l/min) aufrechterhalten. Die Körpertemperatur wird rektal kontinuierlich überwacht und bei 36,5 °C bis 37 °C gehalten.

Vorbereitend werden die Tiere im Bereich des Halses vom Unterkiefer bis zum Sternum geschoren und desinfiziert. Hier erfolgt die Darstellung der rechten A. carotis communis, A. carotis interna und A. carotis externa durch eine Mittellinieninzision der Haut.

### **2 Fadenmodell**

Bei zehn Ratten wird mit dem Fadenmodell ein Verschluss der A. cerebri media verursacht. Dabei werden im Anschluss an die Anästhesie und nach Darstellung der Halsgefäße die A. carotis communis distal und die A. carotis interna transient mit einem 4-0 faden ligiert um Blutungen zu vermeiden. Ein 3 cm langer silikonbeschichteter 4-0 Nylonfaden wird durch eine Arteriotomie der A. carotis communis in die A. carotis interna ca. 16-18 mm jenseits der Karotidbifurkation vorgeschoben, bis ein milder Widerstand darauf hinweist, dass das vordere Fadenende die A. cerebri anterior erreicht hat und somit den Blutfluss zur MCA blockiert. Anschließend wird der Faden mit einer Ligatur fixiert und der noch außerhalb des Gefäßes befindliche Anteil gekürzt. Eine fortlaufende Hautnaht dient dem Wundverschluss und nach Beendigung der Narkose werden die Tiere bis zum vollständigen Erwachen erwärmt.

Bei fünf der Tiere wird 90 Minuten nach dem ersten Operationsabschnitt erneut die Narkose eingeleitet, die Operationsnarbe wieder eröffnet und durch Entfernen des Fadens eine Reperfusion induziert. Wiederum folgt der Wundverschluss und die Erwärmung der Tiere bis zum vollständigen Erwachen.

### **3 Makrosphärenmodell**

Für den Verschluss der A. cerebri media im Makrosphären-Modell werden TiO<sub>2</sub> Makrosphären (BRACE GmbH, Alzenau, Deutschland) mit Durchmessern zwischen 0,315 mm und 0,355 mm verwendet. Nach Freipräparation der rechten Halsschlagader einschließlich ihrer Äste wird bei den 8 Versuchstieren die A. carotis communis distal vorübergehend mit einem 4-0 Faden ligiert. Sowohl die A. pterygopalatina als auch die A. occipitalis und die A. thyroidea superior werden doppelt ligiert und durchtrennt. Hinter dem Abgang der a. pterygopalatina wird auch die A. carotis interna vorübergehend ligiert. Der distale Anteil der A. carotis externa wird proximal doppelt ligiert und anschließend durchtrennt um einen A. carotis externa-Stumpf mit einer Länge von etwa 5 mm zu erhalten. Über diesen Gefäßstumpf wird ein Polyethylenkatheter (Innendurchmesser 0,58 mm, Außendurchmesser 0,965 mm), gefüllt mit 0,9%iger Kochsalzlösung und je 4 der TiO<sub>2</sub>-Makrosphären, eingeführt und die Katheterspitze bis zur Karotisbifurkation vorgeschoben, ohne den Blutfluss von der A. carotis communis in die A. carotis interna zu beeinträchtigen. Nach dem Öffnen der vorübergehenden Ligaturen der A. carotis communis und A. carotis interna werden die Makrosphären einzeln durch langsame Injektion von je 0.05 ml Kochsalzlösung in Richtung Gefäßlumen befördert, bis sie durch den physiologischen Blutfluss in der A. carotis interna passiv in die zerebrale Zirkulation gelangen. Nach Injektion der Makrosphären wird die A. carotis interna vorsichtig mit 0.5 ml Kochsalzlösung gespült. Dabei wird vermieden das Gefäß durch einen zu hohen Druck zu stark zu dilatieren. Anschließend werden die A. carotis communis und A. carotis interna erneut temporär für ca. 20 Sekunden verschlossen um den Katheter entfernen und den Gefäßstumpf der A. carotis externa mit einem 4-0 Faden verschließen zu können. Zum Ende der Operation werden alle transienten Ligaturen entfernt und eine fortlaufende Hautnaht zum Wundverschluss vorgenommen. Die Narkose wird beendet und die Tiere gelangen unter Erwärmung zu Bewusstsein.

### **4 Kontrolltiere**

Bei vier Tieren wird weder mittels Makrosphären-Perfusion noch mittels Fadentechnik ein Verschluss der MCA induziert. Sie dienen als Kontrollen zur Darstellung und Analyse der physiologischen Gefäßmorphologie im Vergleich zu den Ischämie-Modellen.

## 5 Präparation

Vier Stunden nach der jeweiligen Operation werden die Versuchstiere und auch die Kontrolltiere erneut mit 2 Minuten 5% Isofluran in der Luft anästhesiert. Nach einer Thorakotomie kann ein Polyethylenkatheter in den linken Ventrikel eingeführt, der rechte Vorhof inzidiert und anschließend der Blutkreislauf der Ratte mit heparinisierte Kochsalzlösung durchspült werden. Um unnötige Kontrastmittelperfusion zu vermeiden werden sowohl die Aorta ascendens und descendens als auch jeweils die beiden Aa. subclaviae, Aa. carotis externae und Aa. pterygopalatinae ligiert.

Zur Darstellung und Quantifizierung des zerebralen Gefäßbaumes wird das röntgendichte Kontrastmittel Microfil® (Flow Tech, Inc., Carver, Massachusetts, USA), bestehend aus den Komponenten MV Compound, MV Diluent und MV Curing Agent, direkt intraarteriell appliziert. Nachdem die Komponenten gemäß den Angaben des Herstellers im Verhältnis 1:1:0,1 sorgfältig miteinander vermischt werden, kann die Gebrauchslösung in den Aortenbogen injiziert werden um über die A. carotis interna und die Aa. vertebrales die arterielle und venöse zerebrale Zirkulation zu füllen. Durch vorsichtige Injektion kann eine allzu starke Dilatation der Aorta verhindert und können annähernd physiologische Perfusionsdrücke erreicht werden.

Nach 45 Minuten erreicht Microfil eine gummiartige Konsistenz und somit eine gute Stabilität und Haftung an den Gefäßwänden, so dass die Gefäße in ihrer Form fixiert werden. Abschließend wird nach Dekapitation das Gehirn einschließlich der Dura mater aus dem Schädel entnommen und in 4.5%iger Formalinlösung getränkt.

Beim Faden- und Makrosphärenmodell werden die Lokalisation des Fadens bzw. der Makrosphären innerhalb der Zerebralgefäße und das Vorhandensein einer subarachnoidalen Blutung durch visuelle Inspektion festgestellt und sorgfältig dokumentiert. Entsprechend bereits veröffentlichter Kriterien [99] wird von einem suffizienten Verschluss der A. cerebri media ausgegangen, wenn der Ursprung des A. cerebri media-Hauptastes oder all jene Arterien, welche die Blutzufuhr zum A. cerebri media-Hauptstamm gewährleisten (z.B. A. cerebri anterior und A. carotis interna), durch Makrosphären blockiert wird. Das Vorhandensein einer Subarachnoidalblutung führt zum Ausschluss aus der Studie.

## 6 Bildgebung

Sowohl die Mikro-CT- als auch die Nano-CT-Aufnahmen werden mit von der Firma SkyScan (Belgien) entwickelten und hergestellten Scannern (SkyScan 1072 micro-CT; Nano-CT\_2011) am Universitätsklinikum Gießen, Deutschland, durchgeführt.

## 6.1 Mikro-Computertomographie

Der zur Verfügung stehende Computertomograph arbeitet mit Fächerstrahlgeometrie und die Mikrofokusröntgenröhre (Fokusgröße  $8\mu\text{m}$ ) kann bei Beschleunigungsspannungen bis 80 kV bei einer Leistung von 8 W betrieben werden. Eine ca.  $25\mu\text{m}$  dicke Szintillatorschicht dient als Detektor und liegt dem Kamerafenster der gekühlten CCD-Kamera ( $-40^\circ\text{C}$ ) auf. Die maximale geometrische Vergrößerung (das Verhältnis der Abstände von Strahlenquelle zu Detektor und von Strahlenquelle zu Objekt) beträgt ca. 80. Die Messungen erfolgen bei einer Röhrenspannung von 40 kV, einer Stromstärke von  $80\mu\text{A}$  und einer Vorfilterung des Röhrenspektrums mit 3,0 mm Aluminium.

Vor dem Scan-Vorgang werden die Gehirne in Parafilm®-Folie gewickelt um so ein Austrocknen des Gewebes zu vermeiden und sie auf dem drehbaren Probeschlitten zwischen dem CCD-Detektor und der Mikrofokusstrahlenquelle befestigen zu können. Elektronisch kontrolliert führt der Probenträger in definierten Winkelschritten von  $0,45^\circ$  eine vertikale Rotation von  $180^\circ$  um die eigene Achse durch, wobei die Belichtungszeit pro Rotationsschritt 2,4 s beträgt. Mit jedem Rotationswinkelschritt werden Absorptionsbilder bei einer Aquisitionsmatrix von  $1024 \times 1024$  Pixel erzeugt, welche mit Hilfe der Rückprojektionstechnik in isotrope axiale Schnittbilder umgewandelt werden. Anhand eines Rekonstruktionsalgorithmus, dem modifizierten Feldkamp-Fächerstrahl-Algorithmus, werden die virtuellen Schnittbilder berechnet und die Datensätze werden unter Anwendung eines dualen Intel®Xeon™ Prozessors (2x1800MHz, 1024 MB RAM) zu dreidimensionalen Bildern mit 8-bit Grauwertverteilung und einer maximal erreichbaren Endgröße von  $8\mu\text{m}$  kubischen Voxel rekonstruiert. Dies nimmt eine Zeit von etwa 6 Stunden in Anspruch. Mit der Software zur Bildanalyse (Analyze® 6.0) werden die Aufnahmen anschließend beurteilt und quantifiziert.

## 6.2 Nano-Computertomographie

Zur weiterführenden Analyse der Mikrogefäße werden die Proben nach der Mikro-Computertomographie erneut im Nano-Computertomographen (Skyscan 2011 X-ray Nanotomograph) gescannt. Die zu untersuchenden Proben umfassen  $1 \times 1$  cm große Segmente, welche den Gehirnen aus dem jeweiligen Areal von Interesse mit dem Skalpell entnommen werden.

Bei der Mikrofokusröntgenröhre des Nano-Computertomographen handelt es sich um eine Strahlenquelle vom offenen Röhrentyp mit einer LaB<sub>6</sub>-Kathode. Der Elektronenstrahl wird mittels zweier elektromagnetischer Linsen auf die Oberfläche des Targets fokussiert. Das Target (Au) besitzt eine dünne Wolfram-Beschichtung auf der Oberfläche des Berylliumfensters und dient als Austrittsfenster für die Röntgenstrahlung einer minimalen

Ortsauflösung von unter 400 nm. Durch die Kleinwinkelstreuung kann die Darstellung von Objektdetails bis zu einer isotropen Voxelgröße von 150 nm gesteigert werden. Der Röntgendetektor besteht aus einer digitalen hochauflösenden 12-bit-CCD-Kamera (1280 x 1024 Pixel) mit 3.7:1 Faseroptik, die mit Wasser gekühlt wird. Er ist angeschlossen an einen Röntgenszintillator und einen digitalen Frame-Grabber.

Die Proben werden auf einem elektronisch gesteuerten Rotationsgestell befestigt und 180° um die vertikale Achse bei 40 kV gescannt. Pro Rotationsschritt von 0.25° beträgt die Belichtungszeit 2,4 Sekunden. Die geometrische Vergrößerung wird durch die relative Position der Probe zu der Strahlenquelle bestimmt und die Pixelgröße definiert durch die Kegelstrahlgeometrie des Systems. Außerdem begrenzt die Probengröße die maximal mögliche Vergrößerung, da sie sich ihr horizontaler Durchmesser innerhalb des Kegelstrahls befinden muss. Die gewonnenen Daten werden mittels modifiziertem Feldkamp-Kegelstrahl-Algorithmus rekonstruiert und resultieren in zweidimensionalen Bildern mit 8-bit-Grauwertverteilung bestehend aus kubischen Voxeln.

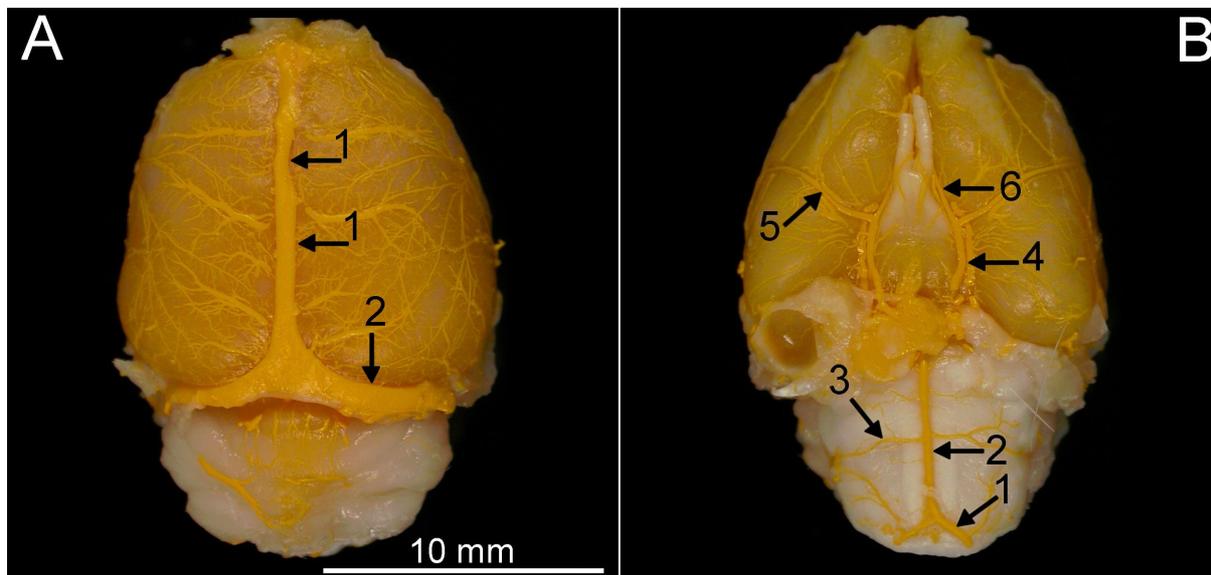
## **7 Statistische Analyse**

Den statistischen Berechnungen dient das Analyseprogramm JMP 6.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Alle Angaben der deskriptiven Statistik in den Texten und Bildern werden als Mittelwertvergleiche  $\pm$  Standardabweichung (MW $\pm$ SEM) dargelegt. Die Daten für den relativen Anteil der Gefäße am Gesamtvolumen der Proben (Vascular Volume Fraction, VVF, in %) und die Unterschiede der Graustufen-Abschwächung werden mit dem einfaktoriellem Varianzanalysentest (one-way ANOVA) und dem unpaaren t-Test ausgewertet. In allen Berechnungen wird die statistische Wahrscheinlichkeit mit einem Wert von  $p < 0,05$  als signifikant angenommen.

### III ERGEBNISSE

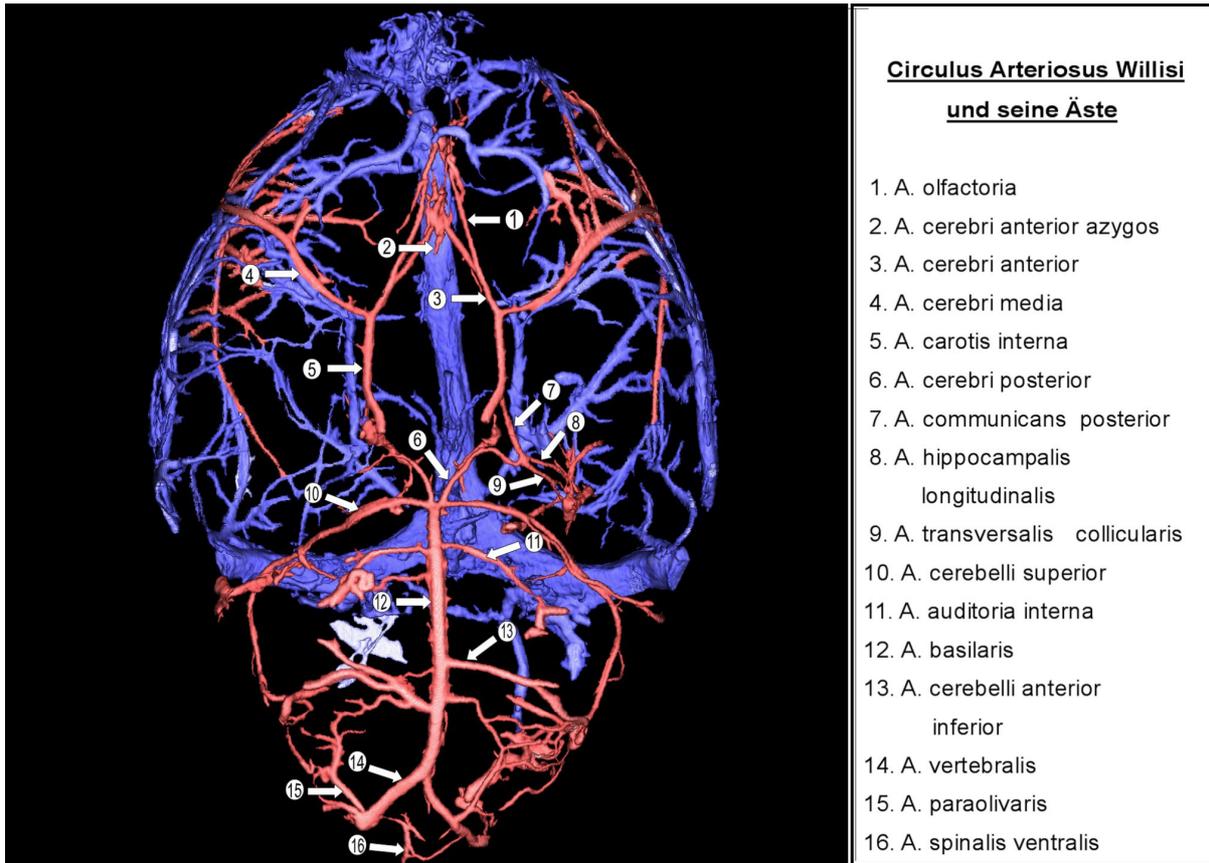
#### 1 Gefäßdarstellung in der Mikro-Computertomographie

Nach Kontrastmittelperfusion mit Microfil® lassen sich bereits makroskopisch die großen zerebralen Gefäße visualisieren (Abb.8). Das über die arteriellen Gefäße verabreichte Kontrastmittel führt über eine kapilläre Passage zu einer homogenen Kontrastierung auch der intrakraniellen venösen Gefäße. Die Kontrastmittelfüllung der großen venösen Gefäße (Sinus) ist eine bereits makroskopische Kontrolle einer ausreichenden und homogenen Gefäßkontrastierung. Von allen untersuchten Gehirnen wurden makroskopische Aufnahmen zur Dokumentation der Perfusion angefertigt.



**Abbildung 8:** Makroskopische Photographie eines Kontrollgehirns nach Kontrastmittelperfusion. Bereits der makroskopische Blick auf das kontrastmittelperfundierte Rattengehirn ermöglicht die Identifizierung der großen zerebralen Gefäße. Die kraniale Ansicht (A) zeigt den Sinus Sagittalis Superior (1) und den Sinus Transversus (2). Blickt man von kranial auf die Gehirnbasis (B), lassen sich die A. vertebralis (1), A. basilaris (2), A. carotis interna (4), A. cerebri media (5), und A. cerebri anterior (6) erkennen.

Nach makroskopischer Inspektion der Gehirne wurden die Mikro- und Nano-CT-Untersuchungen durchgeführt. Abb. 9-11 zeigen die Darstellung der zerebralen Gefäße und die Segmentierung der arteriellen und venösen Strombahn in der Mikro-CT-Bildgebung.



**Abbildung 9:** Gezeigt sind die zerebralen Gefäße der Ratte von kaudal in der Volumenrekonstruktion nach Segmentation der arteriellen und venösen Gefäße im Mikro-CT-Bild. Im Vordergrund sind die arteriellen Gefäße in rot und im Hintergrund das venöse Gefäßsystem in blau sichtbar. Durch die nahezu vollständige Kontrastmittelfüllung des Gefäßbaums bis hin zu den kleinsten Gefäßen, lässt sich der Circulus Arteriosus Willisii mit seinen abzweigenden arteriellen Gefäßen identifizieren.

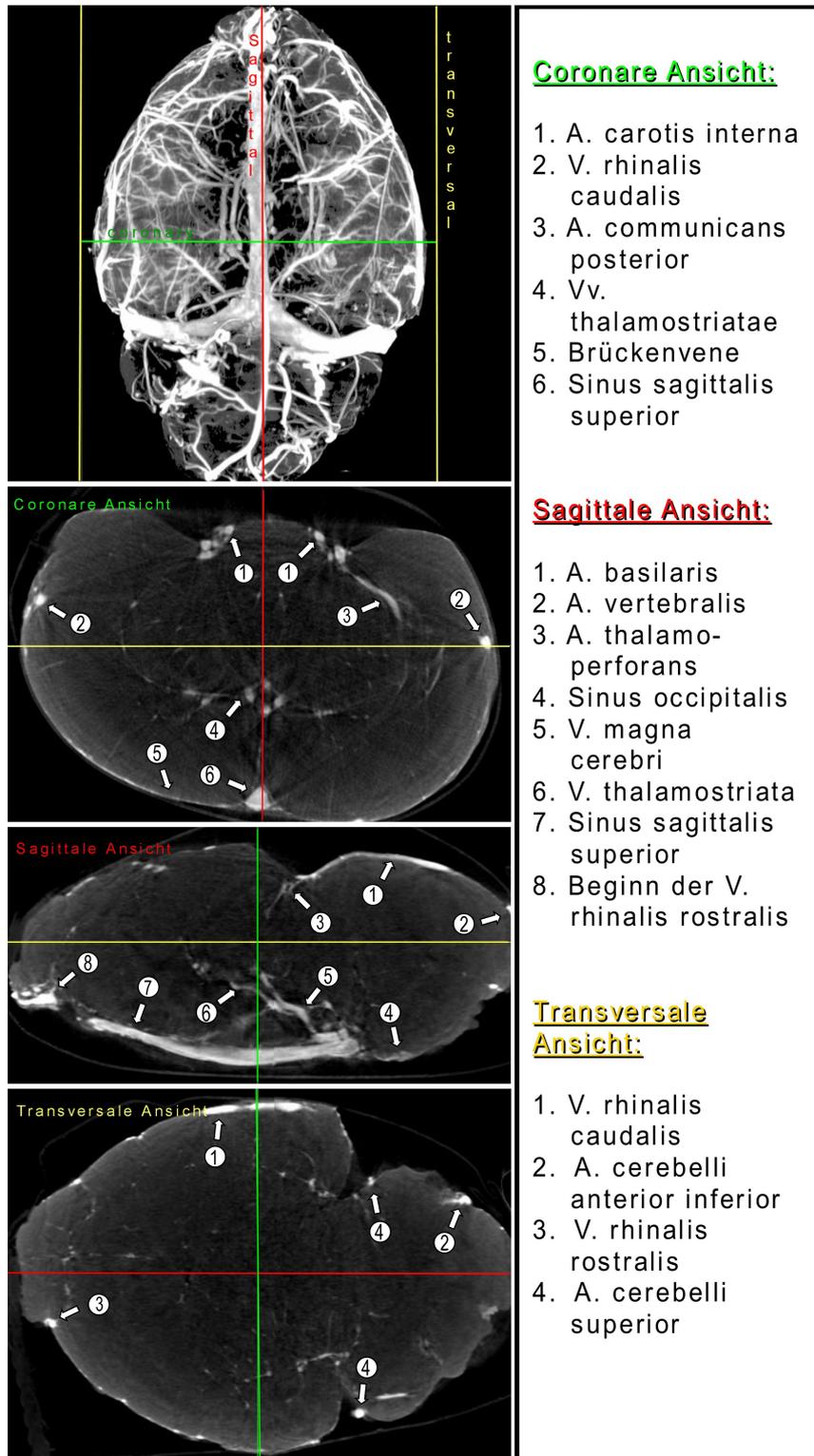


**Zerebrale Venen und**

**Sinus:**

1. Sinus sagittalis superior
2. Brückenvenen
3. Vena rhinalis rostralis
4. Sinus Transversus
5. Sinus sigmoideus
6. Sinus occipitalis
7. Vena rhinalis caudalis
8. Vena magna cerebri
9. Vena thalamostriata

**Abbildung 10:** Die zerebralen Gefäße der Ratte stellen sich hier von kranial in der Volumenrekonstruktion nach Gefäßsegmentation im Mikro-CT-Bild dar. Die venösen Gefäße im Vordergrund sind blau, die Arterien rot im Hintergrund abgebildet. Sowohl die großen venösen Blutleiter, die Sinus durae matris, als auch die kleineren zuführenden zerebralen Venen lassen sich visualisieren.

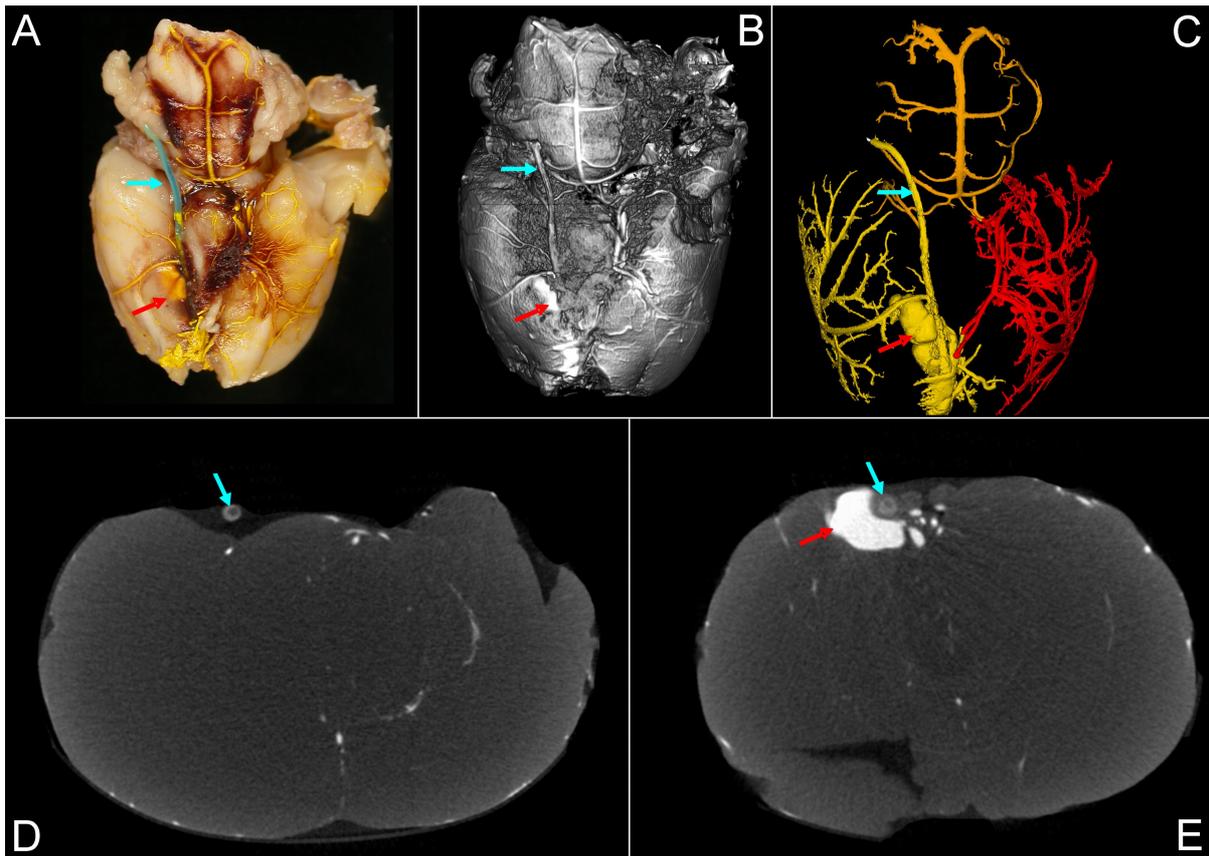


**Abbildung 11:** Mikro-CT-Einzelschnitte in verschiedenen Ebenen. In der Maximum-Intensity-Projektion sind die coronare (grün), die sagittale (rot) und die transversale (gelb) Achse gezeigt. In den verschiedenen Schichtaufnahmen lassen sich die kontrastmittelgefüllten Gefäße als Anschnitte darstellen und bestimmen. Der koronare Schnitt liegt annähernd in der Mitte des Gehirns und zeigt Anschnitte von Hauptgefäßen des Circulus Art. Willisii. Im sagittalen Schnitt sind mit dem Sinus Sagittalis Superior einer der Hauptsinus und eine der wichtigsten gehirn-versorgenden Arterien, die A. basilaris, jeweils in ihrer Längsachse getroffen. In der Ebene des Transversalschnitts stellen sich auch Anschnitte der kleinhirnversorgenden Arterien dar.

## 1.1 Fadenmodell

Beim Fadenmodell ohne Reperfusion lässt sich der intraluminal positionierte Nylonfaden schon bei makroskopischer Sicht auf das kontrastmittelperfundierte Gehirn erkennen. Die Mikro-CT-Bildgebung erlaubt eine exakte Verfolgung des intraluminalen Fadenverlaufs bis zu dessen Ende in der A. cerebri anterior. Der Faden und seine Lokalisation innerhalb der Arterie können mithilfe der Darstellung in unterschiedlichen Projektionen exakt identifiziert werden. So bestätigt sich in Abbildung 12 sowohl in der Oberflächenrekonstruktion und der Volumenrekonstruktion nach Segmentierung der arteriellen Gefäße, als auch in unterschiedlichen koronaren Einzelschnitten die Lokalisation des Nylonfadens in der A. carotis interna mit Fadenende im Bereich der A. cerebri anterior. Die betroffene Seite weist makroskopisch ein etwas blasserer, weniger mit Kontrastmittel angefärbtes Gewebe auf. Auch in der Volumenrekonstruktion nach Segmentierung der Arterien zeigen sich auf der Seite mit Gefäßverschluss weniger Abzweigungen kleinerer Gefäße von den Ästen der A. cerebri media und somit weniger Kontrastmittelfüllung als auf der anderen Seite.

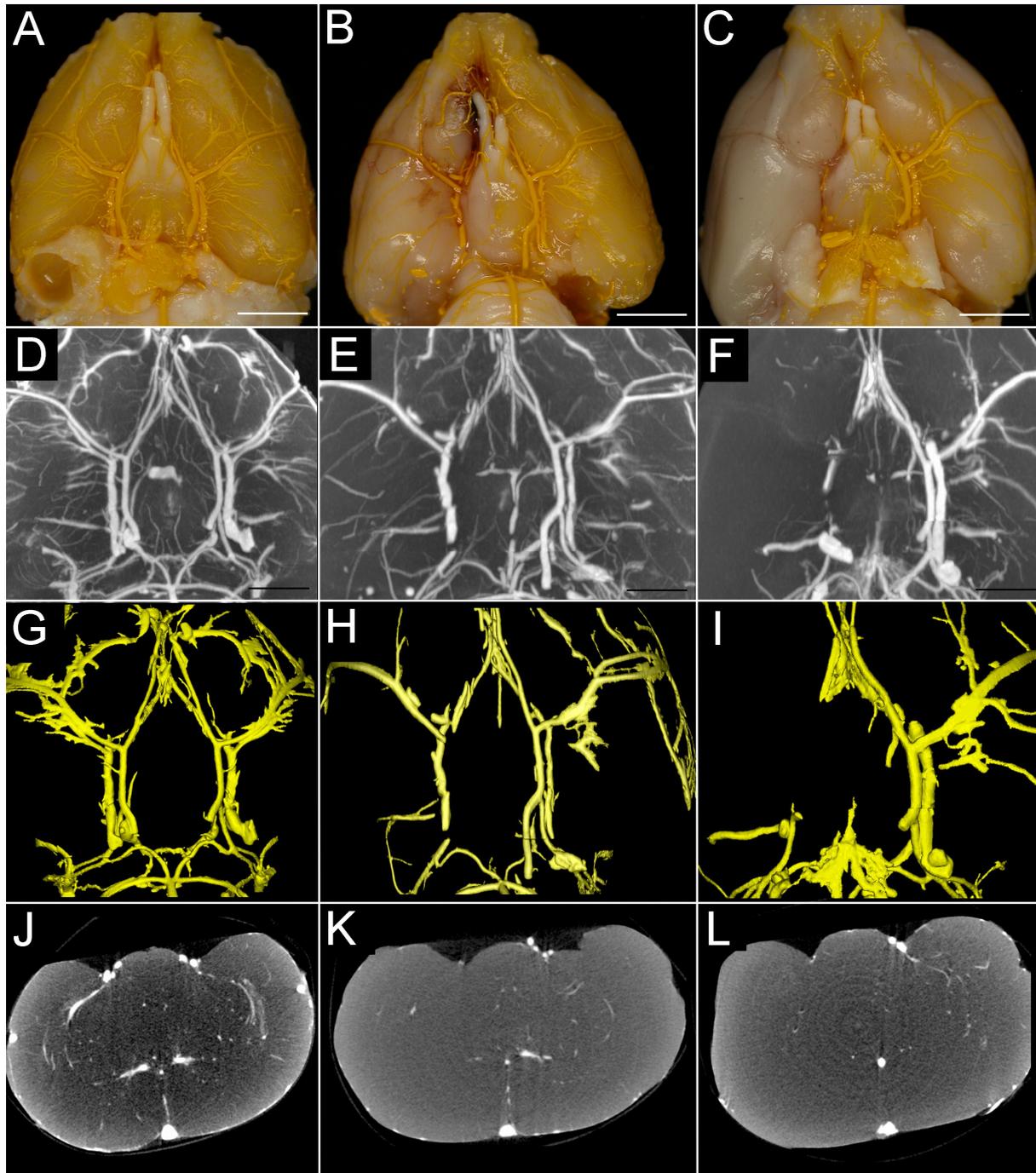
Als eine für diese Gefäßverschlussmethode bekannte Komplikation findet sich bei einem der zehn Tiere des Fadenmodells eine Subarachnoidalblutung, welche sich deutlich in den verschiedenen Mikro-CT-Rekonstruktionen (Abb. 12, roter Pfeil) darstellt. Diese Blutung entsteht als Ergebnis einer Perforation des intrakraniellen Anteils der A. cerebri anterior bei zu weit inseriertem Faden. Von der weiteren Untersuchung der quantitativen Gefäßanalyse wurde dieses Tier ausgeschlossen.



**Abbildung 12:** *Permanentens Fadenmodell nach Kontrastmittelperfusion. In A lässt sich makroskopisch der silikonbeschichtete Nylonfaden (blauer Pfeil) im linken Anteil des Circulus Arteriosus Willisii erkennen. Das Gehirnparenchym erscheint besonders auf der linken Seite blass und wenig angefärbt durch Microfil (gelb). Der rote Pfeil deutet auf die makroskopisch nur zu erahnende Subarachnoidalblutung hin. In der Mikro-CT-Bildgebung lässt sich der Verlauf des Fadens (blauer Pfeil) sowohl in der Oberflächenrekonstruktion in B, als auch in der Volumenrekonstruktion nach Segmentierung der arteriellen Gefäße in C nachvollziehen. In C sind die einzelnen Stromgebiete der Aa. cerebri mediae in gelb bzw. rot dargestellt. Hierbei zeigt die linke Seite eine etwas geringere Zahl an abzweigenden perfundierten Ästen. D und E zeigen zwei koronare Schnittbilder in unterschiedlichen Ebenen, wobei jeweils der Nylonfaden innerhalb der A. carotis interna angeschnitten ist (blaue Pfeile). Die Subarachnoidalblutung (roter Pfeil) lässt sich in allen Mikro-CT-Rekonstruktionen identifizieren (B, C, E).*

Die Abbildung 13 vergleicht die Bilder eines Kontrollgehirn mit zwei Gehirnen, deren Gefäße nur teilweise bzw. komplett okkludiert sind. Das Gehirn mit dem partiell verschlossenen Gefäßbaum lässt bereits makroskopisch auf der betroffenen Seite eine mindere Microfil-Perfusion erkennen. Die Mikro-CT-Darstellungen in der Maximum-Intensity-Projektion und der Volumenrekonstruktion bilden diesen Gefäßbaum mit deutlich weniger perfundierten abzweigenden Gefäßen im Vergleich zum Kontrollgehirn ab. Beim vollständigen Verschluss der A. carotis interna und A. cerebri media ist der Verlust perfundierter Gefäße im Vergleich zum nur teilweise okkludierten Gefäßbaum sowohl makroskopisch als auch in der Maximum-Intensity-Projektion und der Volumenrekonstruktion offensichtlich. Die koronaren Einzelschichten der unterschiedlichen Gehirne auf einheitlicher Ebene ermöglichen den

Vergleich der Anzahl querschnittener perfundierter Gefäße. Hier ist eine Reduktion der Gefäße von Kontrollgehirn zu teilweise verschlossenem und schließlich vollständig verschlossenem Gefäßbaum deutlich.



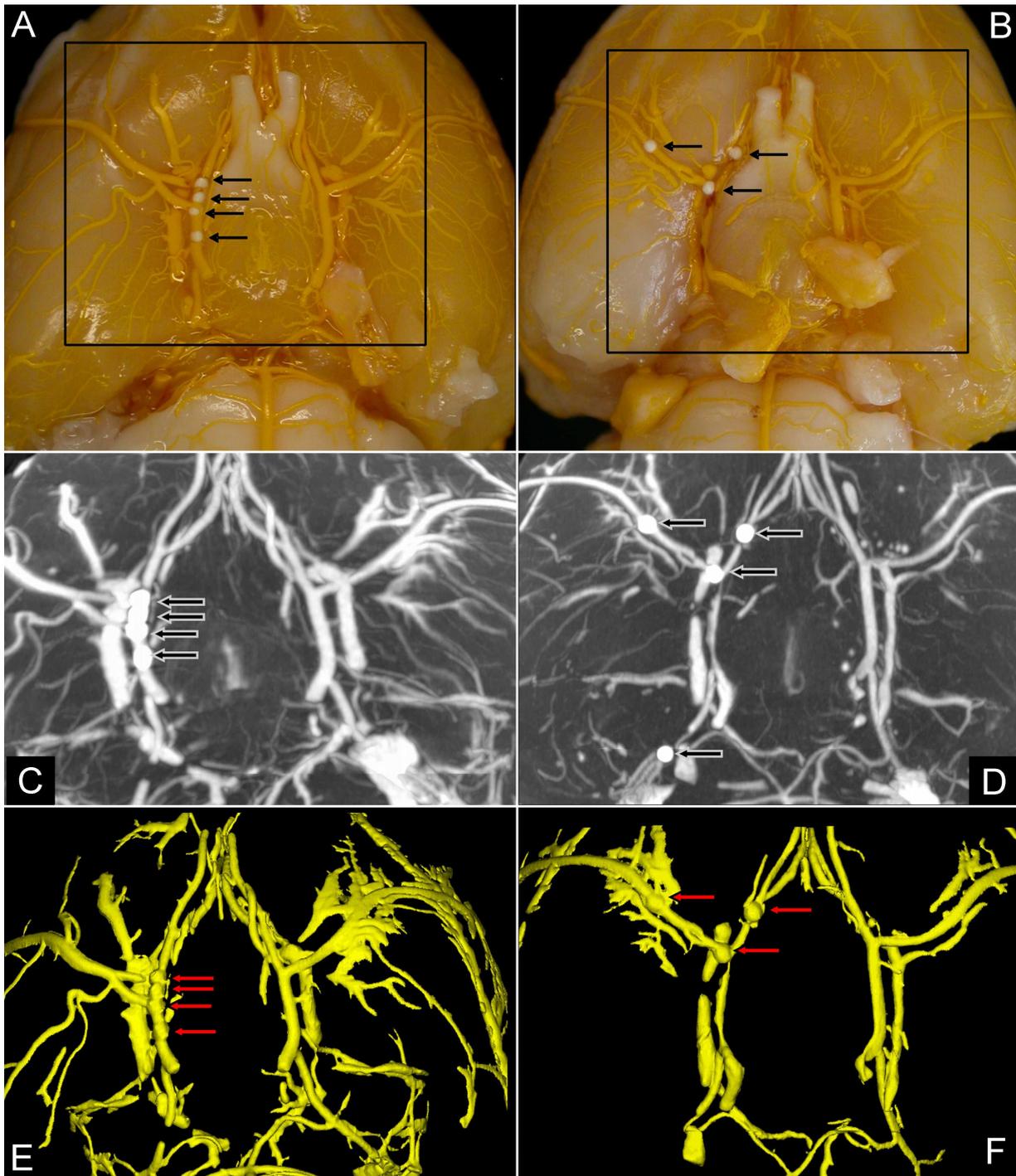
**Abbildung 13:** Fadenmodell nach Entfernen des Fadens und Kontrastmittelperfusion. In A, D, G und J finden sich die Darstellungen eines Kontrollgehirns jeweils in makroskopischer Ansicht (A), als Mikro-CT Maximum-Intensity-Projektion (D), in der Volumenrekonstruktion nach Extraktion der arteriellen Gefäße (G) und im koronaren Mikro-CT-Einzelschnitt. Im Vergleich dazu stehen ein Gehirn mit partiell verschlossenem Gefäßbaum (B, E, H, K) und eines mit vollständig okkludierter A. carotis interna und A. cerebri media (C, F, I, L) in ebensolchen makroskopischen bzw. Mikro-CT Abbildungen. In allen vier Ansichten zeigt das Kontrollgehirn die höchste Perfusionsintensität mit den meisten kontrastmittelgefüllten

*Gefäßen. Die mindere Kontrastmittelperfusion und die fehlende Abbildung vor allem kleiner abzweigender Gefäße der A. cerebri media ist beim Gehirn mit partieller Okklusion am deutlichsten in der Volumenrekonstruktion nach Extraktion der Arterien (H). Der vollständige Verschluss des Gefäßbaumes beim dritten Gehirn ist sowohl makroskopisch (C) als auch in den Mikro-CT-Rekonstruktionen durch den kompletten Kontrastmittelausfall im Bereich der A. cerebri media offensichtlich.*

---

## 1.2 Makrosphärenmodell

Die Visualisierung der Rattengehirne des Makrosphärenmodells mittels Mikro-CT ermöglichte in jedem der Gehirne den Nachweis aller vier applizierten Makrosphären und deren Lokalisation innerhalb der basalen zerebralen Gefäße. Bei zwei der Tiere fanden sich die Makrosphären ausschließlich in der A. cerebri anterior und/oder A. cerebri posterior. Diese Tiere wurden somit aus der Untersuchung ausgeschlossen, da sie nicht den vorbestimmten Kriterien eines Verschlusses der A. cerebri media entsprachen. Die Abbildung 14 zeigt typische Verteilungsmuster der Makrosphären in den übrigen Rattengehirnen. Der makroskopische Blick auf die Gehirnbasis lässt zunächst bereits einen Großteil der TiO<sub>2</sub>-Kugeln entdecken, wobei sich erst mittels der Mikro-CT-Rekonstruktionen (Maximum-Intensity bzw. Volumenrekonstruktion) die exakte Lokalisation der Kugeln in den einzelnen zerebralen arteriellen Gefäßen feststellen lässt. Da der Durchmesser der Makrosphären (zwischen 0,315 und 0,355 mm) signifikant größer ist als derjenige der verschlossenen Gefäße (zwischen 0.175 und 0.295 mm) wurde von einer kompletten Okklusion ausgegangen. Dennoch weist die Mikro-CT eindeutig nach, dass die Kontrastmittelperfusion der betroffenen Gefäße nicht mit den Makrosphären abbricht, sondern auch die Gefäßabschnitte jenseits der Kugeln mit Microfil perfundiert sind. Dies kann seine Begründung im Vorhandensein oder der Entstehung einer Kollateralisierung durch die umgebenden zerebralen Gefäße finden, wobei diesbezüglich im Folgenden die Nano-CT-Untersuchungen der näheren Analyse dienen (siehe Kap. 2)



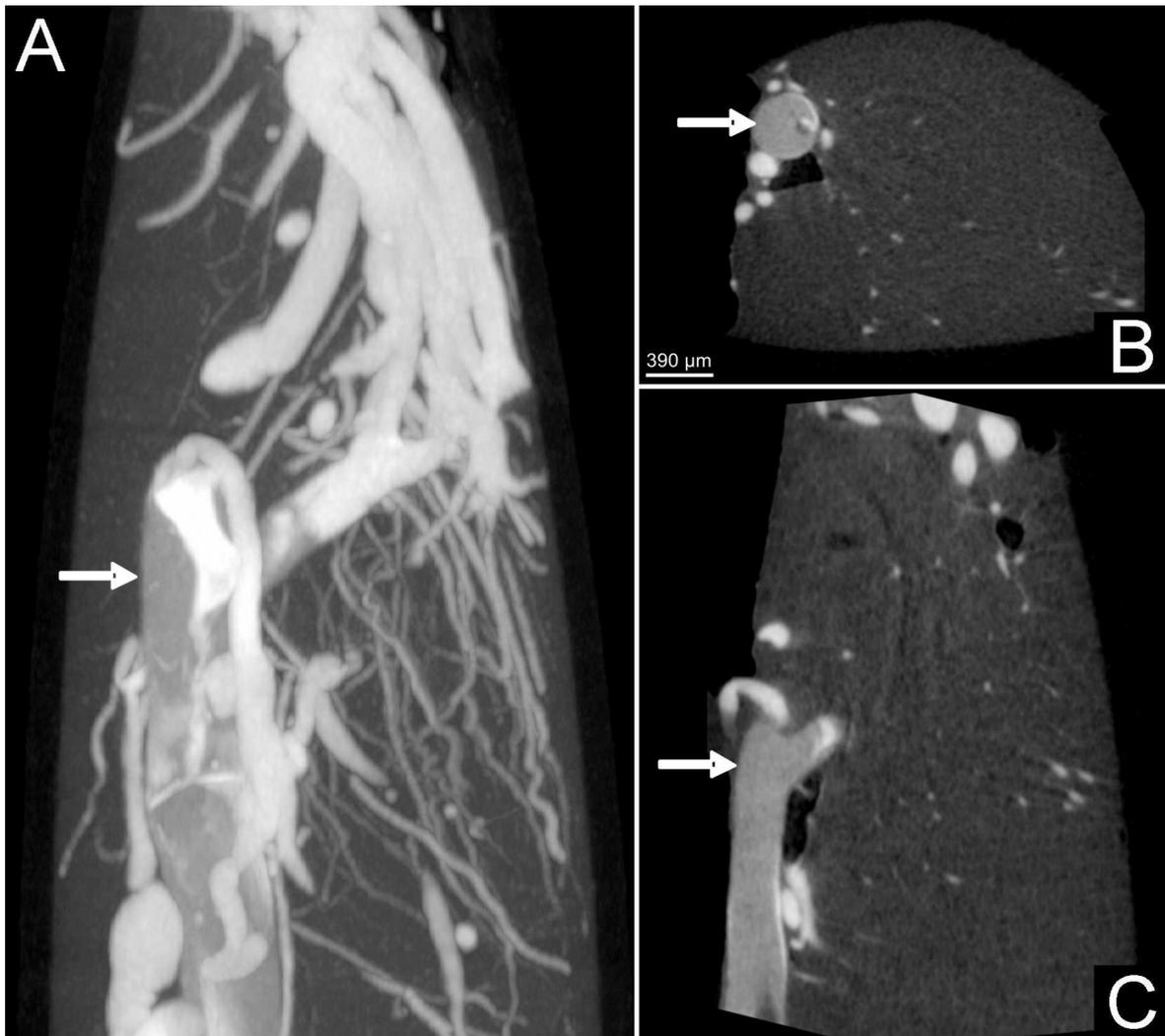
**Abbildung 14:** Zwei Gehirne des Makrosphärenmodells nach Kontrastmittelperfusion. In makroskopischer Photographie (A, B) und in Mikro-CT-Rekonstruktionen (C und D in Maximum-Intensity-Projektion, bzw. E und F in Volumenrekonstruktion nach Extraktion der Arterien) lassen sich jeweils alle 4 applizierten Makrosphären identifizieren. In A, C und E finden sich die Makrosphären hintereinander aufgereiht im Verlauf der A. carotis interna, bzw. in deren Verlängerung in der A. cerebri anterior (Pfeile). Im zweiten Gefäßbaum (B, D, F) sind die TiO<sub>2</sub>-Kugeln sowohl in der A. cerebri media und an deren Abgang von der A. carotis interna, also auch in der A. cerebri media und A. cerebri posterior lokalisiert.

## **2 Gefäßdarstellung in der Nano-Computertomographie**

Zur detaillierten Darstellung der arteriellen Gefäßstrombahn wurden sowohl im Faden-, als auch im Makrosphärenmodell, die Grenzzonen zwischen Gefäßverschluss und Perfusion mittels Nano-CT untersucht. Dazu wurden die betreffenden Areale der Makrosphären und des Fadens aus den Rattenhirnen präpariert und Hirnvolumina mit einer Größe von ca. 5 x 5 x 5 mm im Nano-CT erfasst.

### **2.1 Fadenmodell**

Im Fadenmodell konnte mittels Nano-CT die exakte und korrekte Position der Spitze des Nylonfadens in der A. cerebri anterior bestimmt werden. Jenseits des Fadens ließ sich eine schwache Kontrastmittelfüllung der A. cerebri media ausmachen, welche auf eine teilweise verbleibende Restperfusion hindeutet. Sowohl in der Maximum-Intensity-Projektion als auch in verschiedenen Einzelschnitten lassen sich kleine Kollateralgefäße explizit identifizieren. Des Weiteren weist eine spärliche, aber doch sichtbare Kontrastmittelfarbe zwischen der Gefäßwand und dem Faden auf eine inkomplette Okklusion der A. carotis interna durch den Nylonfaden hin.

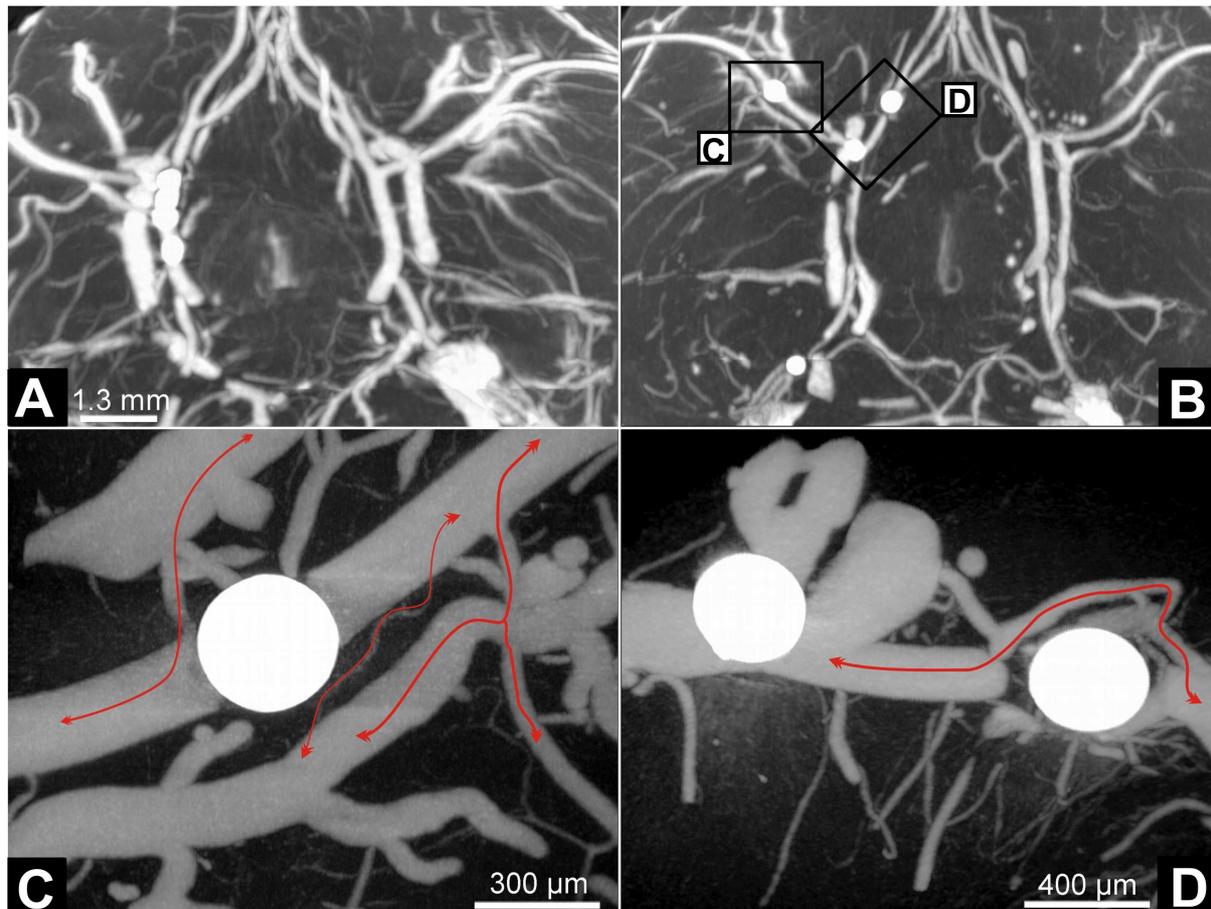


**Abbildung 15:** Nano-CT-Bildgebung im Fadenmodell nach Kontrastmittelperfusion. A zeigt den Kontrastmittelabbruch an der Position des Fadenendes in der A. cerebri anterior, (Pfeil). Deutlich sind kleinste drainierende Kollateralgefäße zu erkennen. In den koronaren und transversalen Einzelschichten (B und C) lässt sich ein schwacher heller Randsaum um den Faden erkennen, welcher darauf schließen lässt, dass dieser das Gefäß nicht vollständig verschließt.

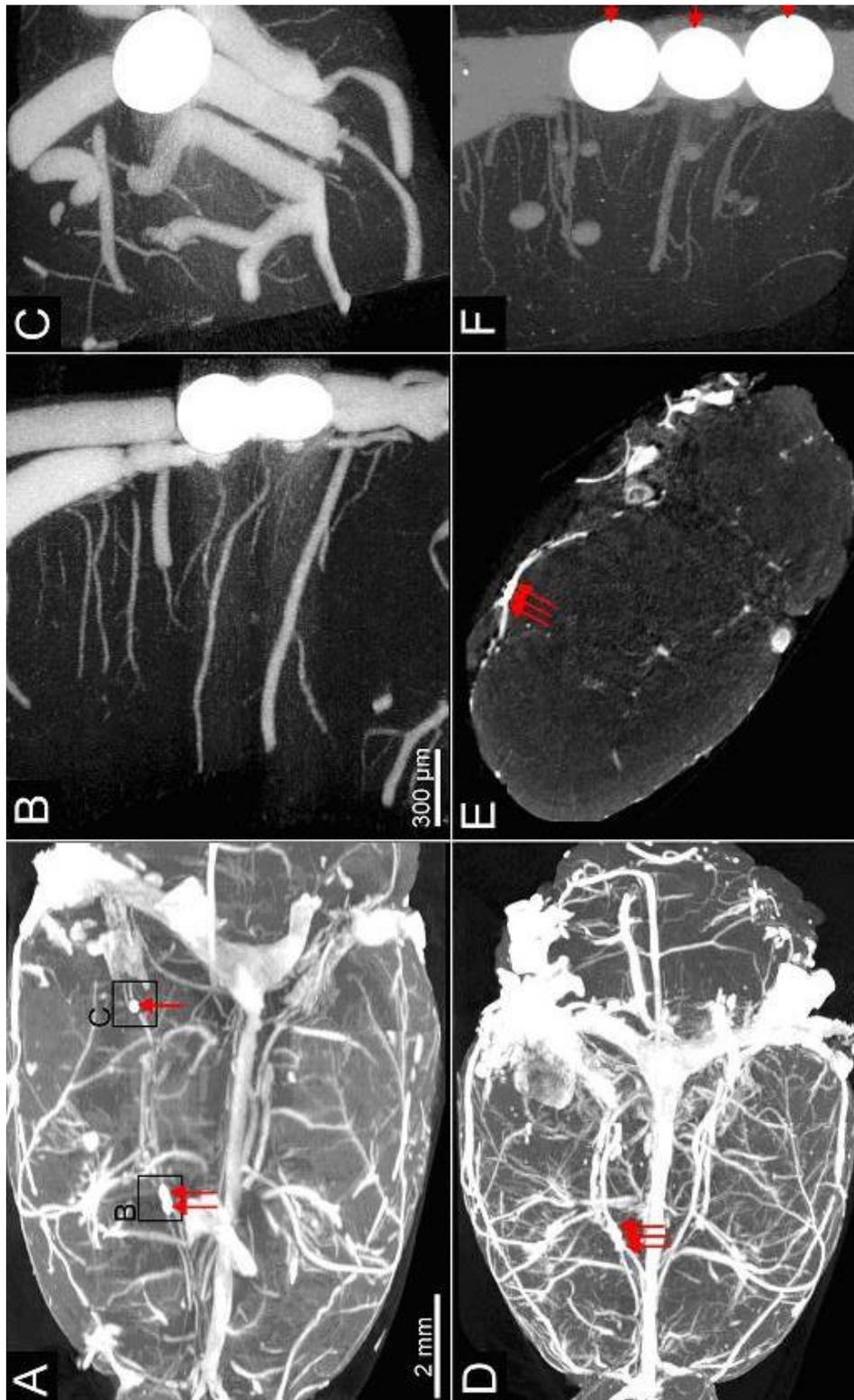
## 2.2 Makrosphärenmodell

Stellt man den Gefäßverschluss durch die  $\text{Tio}_2$ -Kugeln im Nano-CT dar, so lässt sich die Position der Makrosphären innerhalb des Gefäßes exakt feststellen. Die distal der Makrosphären vorhandene Kontrastmittelfüllung, welche sich bereits in der Mikro-CT-Bildgebung präsentierte, kann durch die Nano-CT-Bilder bestätigt werden. Darüber hinaus liefern diese mit der Darstellung kleinster Kollateralgefäße in der Umgebung des verschlossenen Gefäßabschnittes eine Erklärung für die Füllung des distalen Anteils der A. cerebri media mit Kontrastmittel. Die Nano-CT-Bildgebung liefert keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Kontrastmittel zwischen den Makrosphären und der Gefäßwand, so dass

von einem vollständigen Verschluss des Gefäßes durch die TiO<sub>2</sub>-Kugeln ausgegangen werden kann.



**Abbildung 16:** Mikro-CT- und Nano-CT-Aufnahmen des Makrosphärenmodells. In der Mikro-CT-Maximum-Intensity-Projektion in B sind die Ausschnitte der Nano-CT-Bilder mit einer einzelnen Makrosphäre in der A. cerebri media in C bzw. zwei Makrosphären in der A. carotis interna und A. cerebri anterior in D angegeben. Sowohl in C als auch in D sind deutlich die Kollateralen identifizierbar, welche den Blut- bzw. Kontrastmittelfluss zwischen den durch Makrosphären getrennten Gefäßabschnitten ermöglichen (rote Pfeile). Die Makrosphären verursachen eine vollständige Okklusion der Gefäße, zwischen ihnen und der Gefäßwand ist kein Kontrastmittel detektierbar.



**Abbildung 17:** Maximum-Intensity-Projektionen des Makrosphärenmodells bei zwei Tieren in Mikro- und Nano-CT. In A lässt die Mikro-CT-Aufnahme mit Sicht von kranial auf das Rattengehirn die Makrosphären in der A. cerebri anterior und A. cerebri posterior identifizieren und weist auf die Lokalisation der Nano-CT-Ausschnittvergrößerungen in B und C hin. In B zeigt die Nano-CT-Aufnahme zwei dicht nebeneinander liegende Makrosphären, welche die A. cerebri anterior vollständig verschließen, und die an dieser Stelle abzweigenden Kapillaren. In C findet sich eine einzelne  $\text{TiO}_2$ -Kugel in der A. cerebri posterior und kleinste die Gefäßabschnitte verbindende Kollateralen. Die Makrosphären des Gehirns in D, E und F liegen hintereinander aufgereiht in der A. cerebri anterior. Die Nano-CT-

*Aufnahme (F) deutet an, dass die mittlere Makrosphäre im Gegensatz zu den beiden sie umgebenden Makrosphären das Gefäß nicht vollständig verschließt (rote Pfeile). Da bei diesen beiden Tieren wegen der Lokalisation der Makrosphären nicht der geforderte Verschluss der A. cerebri media erfolgen konnte, wurden diese aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen (s.o.). Diese Aufnahmen dienen lediglich der Detektierung von Kollateralen im Bereich eines Gefäßverschlusses durch Makrosphären mittels Nano-CT-Bildgebung.*

---

### **3 Quantitative Bildanalyse**

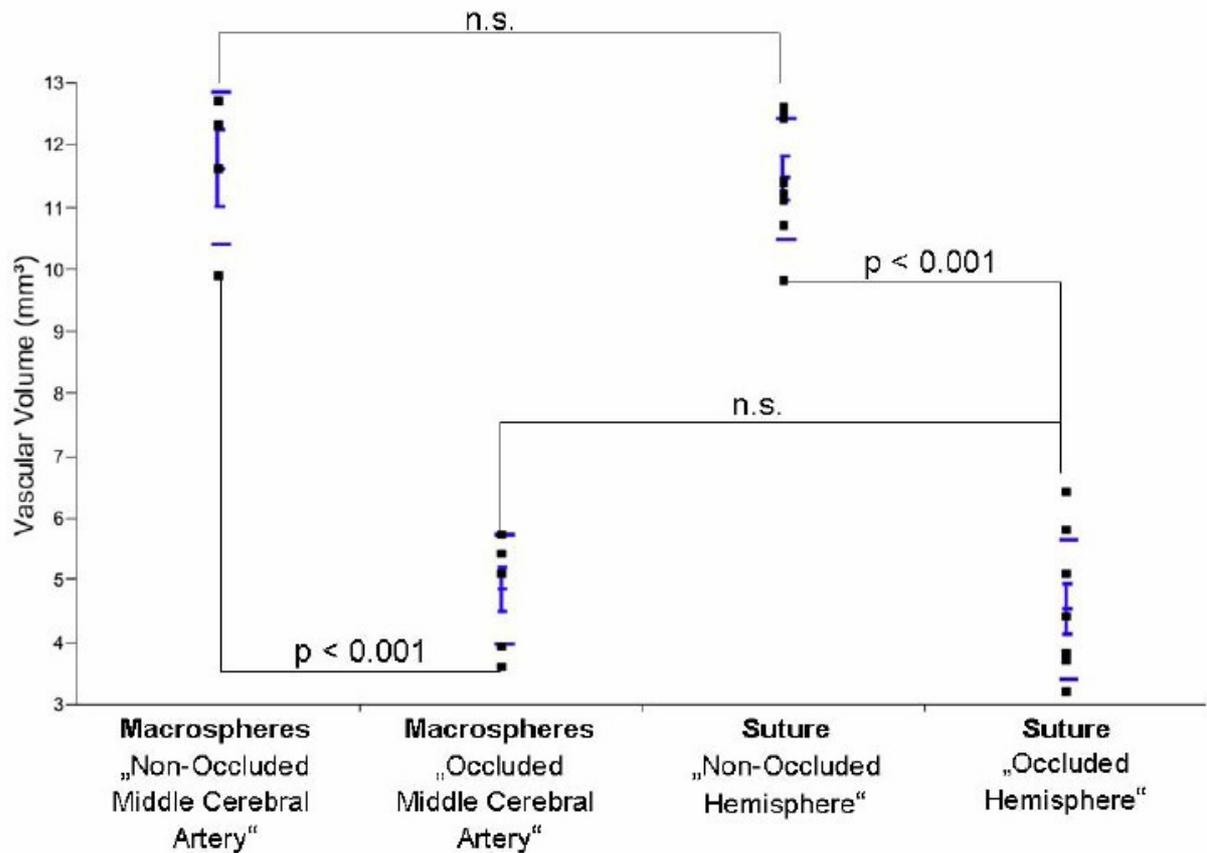
Um die zerebralen Gefäßveränderungen in den Ischämie modellen der Ratte zu quantifizieren, können die Gefäßvolumina der Gehirne des Fadenmodells bzw. des Makrosphärenmodells mit den Gefäßvolumina der nicht betroffenen Gehirnhälfte bzw. der Kontrollgehirne mithilfe der Analysesoftware verglichen werden. Des Weiteren sind die Unterschiede in der Graustufenabschwächung in den Perfusionsterritorien der A. cerebri media in den jeweiligen Modellen vergleichend darstellbar.

#### **3.1 Vaskuläre Volumina**

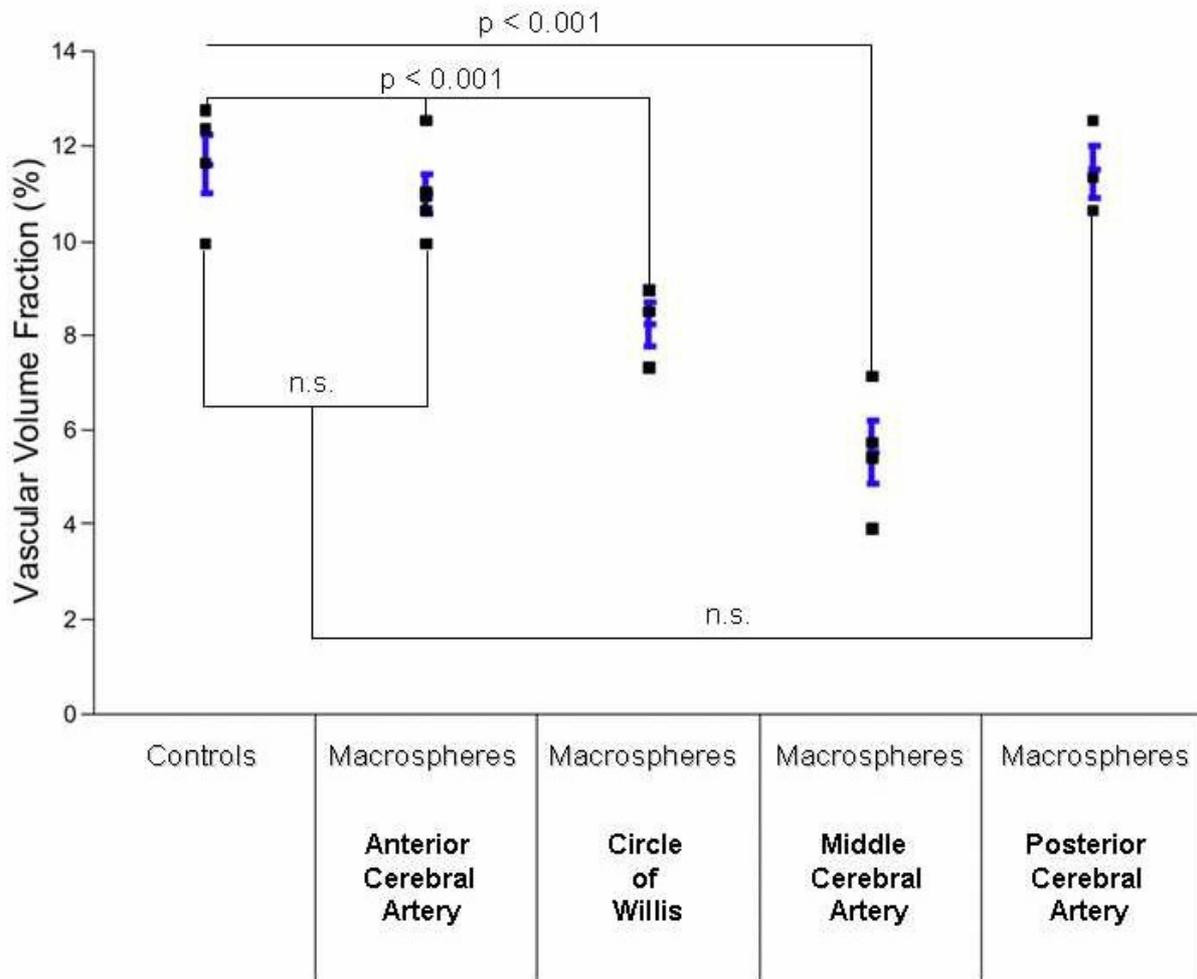
Die Messung der Gefäßvolumina auf der Seite des permanenten Gefäßverschlusses des Fadenmodells ergibt im Vergleich zur nicht-okkludierten Hemisphäre einen signifikant niedrigeren Volumenanteil gemessen am Gesamthirnvolumen ( $4,02 \pm 1,67 \text{ mm}^3$  vs.  $11,5 \pm 1,05 \text{ mm}^3$ ;  $p < 0,001$ ; Tab. 3). Im Makrosphärenmodell resultiert bei erwünschter Positionierung der Makrosphären in der A. cerebri media der Gefäßverschluss verglichen mit der nicht-betroffenen Gehirnhälfte bzw. den Kontrollen in einem signifikanten Abfall des vaskulären Volumenanteils ( $5,5 \pm 1,3 \text{ mm}^3$  vs.  $11,6 \pm 1,2 \text{ mm}^3$ ;  $p < 0,001$ ; Tab. 3). Liegen die Makrosphären jedoch in der A. cerebri anterior bzw. A. cerebri posterior, so zeigt sich erwartungsgemäß im Kontrollvergleich kein signifikanter Unterschied ( $p < 0,2$ ).

		Number of Macrospheres	Vessel Diameter ( $\mu\text{m}$ )	Macrosphere Diameter ( $\mu\text{m}$ )	Occluded Vessel Territories	Collaterals via	Vascular Volume ( $\text{mm}^3$ )
Macrospheres	Anterior Cerebral Artery	7	$186 \pm 6^*$	$334 \pm 11$	No	Contralateral Hemisphere	$10.9 \pm 0.9$
	Middle Cerebral Artery	7	$203 \pm 13$	$335 \pm 7$	Partial	Thalamo-striatal Arteries	$5.5 \pm 1.3^*$
	Posterior Cerebral Artery	5	$175 \pm 11^*$	$333 \pm 4$	No	Contralateral Hemisphere	$11.4 \pm 0.9$
	Circle of Willis	16	$205 \pm 16$	$333 \pm 8$	Partial	Unknown	$8.2 \pm 0.8$
Suture	Occluded Hemisphere				Partial	Unknown	$4.02 \pm 1.6^*$
	Non-Occluded Hemisphere				No		$11.5 \pm 1.1$
Controls							$11.6 \pm 1.2$

**Tabelle 3:** Die Gefäßdurchmesser zeigen signifikante Unterschiede zwischen der A. cerebri anterior und A. cerebri posterior versus der A. cerebri media und dem Circulus arteriosus Willisii (\*  $p < 0,002$ ). Die Werte der Makrosphärendurchmesser sind signifikant höher als die Werte für den Durchmesser der okkludierten Gefäße ( $p < 0,001$ ). Der vaskuläre Volumenanteil fällt sowohl beim Vorhandensein von Makrosphären in der A. cerebri media ( $5,5 \pm 1,3 \text{ mm}^3$ ) und im Circulus Willisii ( $8,2 \pm 0,8 \text{ mm}^3$ ), als auch beim Fadenmodell auf der verschlossenen Gehirnhälfte ( $4,02 \pm 1,6 \text{ mm}^3$ ) im Vergleich zu den Kontrollen ( $11,6 \pm 1,2 \text{ mm}^3$ ) signifikant niedriger aus ( $p < 0,001$ ).



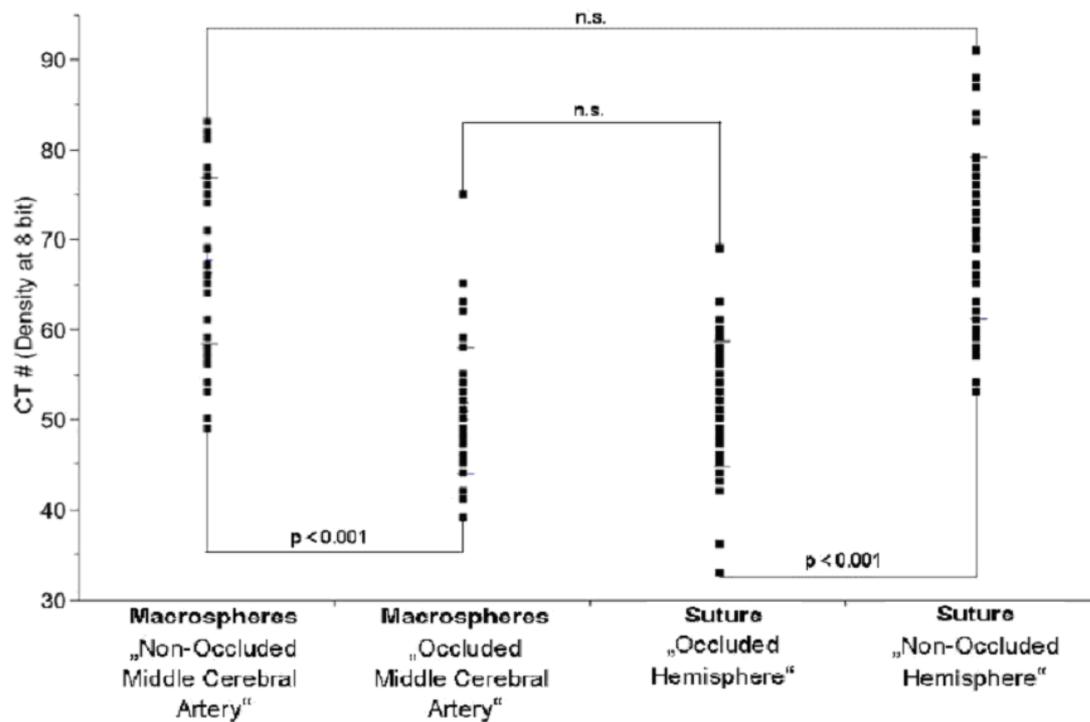
**Abbildung 18:** Vergleich des vaskulären Volumenanteils bei Tieren des Makrosphären- und Fadenmodells. Bei beiden Ischämie modellen wurden zwischen der Hemisphäre mit okkludierter A. cerebri media und Gehirnhälfte ohne Gefäßverschluss signifikante Unterschiede im relativen vaskulären Volumenanteil festgestellt ( $p < 0,001$ ). Die Volumenanteile der beiden Ischämie modellen im Vergleich entsprechen sich, es ist kein signifikanter Unterschied zwischen Makrosphären- und Fadenmodell zu verzeichnen ( $p < 0,2$ ).



**Abbildung 19:** Makrosphärenmodell – Vaskuläre Volumenanteile bei verschiedenen Makrosphären-Perfusionsgebieten im Vergleich zu Kontrollen. Signifikant niedriger als bei den Kontrollen zeigt sich die Volumenfraktion für A. cerebri media und Circulus Willisii, die weil weder für A. cerebri posterior noch A. cerebri anterior die Werte signifikant unterschiedlich sind.

### 3.2 Absorption

Mittels Analyze®-Software können im vaskulären Perfusionsgebiet der A. cerebri media die Graustufenabschwächungen der verschiedenen Ischämie Modelle vermessen und miteinander verglichen werden. Signifikant niedrigere Graustufenwerte zeigen sich beim Makrosphärenmodell auf okkludierter im Vergleich zur nicht-verschlossenen Hemisphäre ( $p < 0,001$ ). Ebenso sinken beim Fadenmodell die Graustufenwerte der Gehirnhälfte mit permanentem Verschluss der A. cerebri media im Vergleich zur nicht-betroffenen Hemisphäre signifikant ( $p < 0,001$ ). Diese erniedrigten Grauwerte sind hinweisend auf ein durch die fokale Ischämie bedingtes progressives Ödem.



**Abbildung 20:** Unterschiede der Grauwertverteilungen im Perfusionsgebiet der A. cerebri media beim Faden- und Makrosphärenmodell. Die Unterschiede sind in beiden Ischämie modellen zwischen jeweils okkludierter und nicht-okkludierter Hemisphäre signifikant ( $p < 0,001$ ), wobei die verminderten Graustufenwerte auf Seiten des Gefäßverschlusses auf eine zunehmende Ödematisierung hindeuten.

## **IV DISKUSSION**

Die adäquate Behandlung des akuten Schlaganfalls stellt die moderne Medizin bis heute vor ein weitgehend ungelöstes Problem. Die im Vergleich zu anderen Organen enorm hohe Sensibilität des Gehirnparenchyms gegenüber einer gestörten Durchblutung führt bereits kurze Zeit nach Unterbrechung der Sauerstoff- und Glukosezufuhr zur unwiederbringlichen Schädigung von Nervenzellen. Demzufolge steht der detaillierten Untersuchung von Schlaganfallpathogenese und –verlauf, sowie der Entwicklung neuer und effektiver Therapiekonzepte ein besonders hoher Stellenwert in der Schlaganfallforschung zu. Dabei nehmen tierexperimentelle Studien wie die Ischämie Modelle am Nagetier eine Schlüsselposition ein, zumal sie bedeutende Einsichten in die zugrunde liegende Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls bieten und hinweisende Erkenntnisse für die klinische Anwendung liefern können.

In der vorliegenden Arbeit werden die Evaluation und der Vergleich der vaskulären Anatomie der Ratte im Fadenmodell und Makrosphärenmodell zur fokalen zerebralen Ischämie mithilfe neuartiger Bildgebung präsentiert. Die Mikro- und Nano-Computertomographie sollen mit ihrer hochauflösenden Technik die vollständigen zerebralen Gefäßbäume darstellen und somit morphologische Veränderungen erkennbar, vergleichbar und quantifizierbar machen.

### **1 Tiermodelle**

Die Fadentechnik zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien bei der Ratte kommt bis heute bei tierexperimentellen Schlaganfallstudien am häufigsten zur Anwendung. Eine Reihe an Vorteilen gegenüber anderen Techniken sorgt für die relativ hohe Verlässlichkeit dieses Modells.[53;100] Da es ein endovaskuläres Modell darstellt, muss für den Gefäßverschluss die Schädelkalotte nicht eröffnet werden, wie es beispielsweise für die direkte Ligatur der A. cerebri media nötig ist. Dadurch können unerwünschte Nebeneffekte wie ein verminderter Hirndruck oder Subarachnoidalblutungen vermieden werden. Des Weiteren gestattet das Fadenmodell die Simulation beider fundamentaler Zustände der zerebralen Ischämie: der permanente Gefäßverschluss auf der einen Seite und andererseits die Reperfusion nach Ischämie durch Entfernen des Fadens zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Okklusion. Da das Eintreten einer Reperfusion und vor allem der zeitliche Zusammenhang für den Erhalt bzw. Verlust der ischämischen Penumbra von fundamentaler Relevanz ist, sind beide Ischämieformen maßgeblich bedeutend für den

menschlichen Schlaganfall und müssen beispielsweise bei der präklinischen Testung neuroprotektiver Substanzen Berücksichtigung finden.[101]

Allerdings lassen sich dem Fadenmodell auch verschiedene gravierende Nachteile zuweisen, durch welche dieses Ischämiemodell in jüngster Zeit mehr und mehr in die Kritik geraten ist. So weisen Laser-Doppler-Messungen darauf hin, dass bisweilen auch bei scheinbar korrekt platziertem Faden frühzeitige Reperfusionen auftreten können. Diese können durch eine unbemerkte Dislokation des Okkluders oder bei weit gestellten Gefäßen durch einen verbleibenden Blutfluss zwischen Faden und Gefäßwand zustande kommen. Ein solcher unerwünschter Nebeneffekt untergräbt die Möglichkeit der strikten Differenzierung zwischen permanenter und transienter Ischämie.[53] Problembehaftet ist auch das Platzieren des Fadens in den basalen Gehirnarterien, welches eines gewissen manuellen Geschicks bedarf und nur unter einem Operationsmikroskop sicher durchführbar ist. Unter komplexeren Versuchsbedingungen, wie beispielsweise an wachen Versuchstieren oder innerhalb eines Magnetresonanztomographen, ist die Durchführbarkeit dieses Modells stark eingeschränkt.[102-104] Wird der Okkluder beim Einführen in das Gefäß zu weit vorgeschoben, so können durch Gefäßperforationen Subarachnoidalblutungen induziert werden, wie es auch in unserer Studie bei einem von zehn Tieren aufgetreten ist, oder mechanische Läsionen des Endothels die Entstehung intraluminaler Thromben zur Folge haben.[105-107] Im entgegengesetzten Fall, wird der Faden unzureichend weit eingeführt, kann es zu einem unvollständigen Verschluss der A. cerebri media kommen.[57]

Einer der bedeutendsten Nachteile der Technik des Fadenmodells besteht in der Verlegung der A. hypothalamica, welche der distalen A. carotis interna entspringt. Die daraus folgende Infarzierung des Hypothalamus, welcher die Temperaturregulation entscheidend beeinflusst, führt zu einem Körpertemperaturanstieg von bis zu 40°C. Eine solche pathologische Hyperthermie wirkt sich erschwerend auf die ischämische Schädigung des Gehirns aus und stört nachweislich die Wirksamkeit neuroprotektiver Therapie. Da sich eine Hypothalamusschädigung jedoch erst bei einer Ischämiedauer von über 120 Minuten entwickelt, kann diese durch Entfernung des Fadens nach 90 Minuten (transiente Ischämie) umgangen werden und der Hypothalamus kann sich vollständig erholen.[55;108;109]

Das Makrosphärenmodell wurde entwickelt um vor allem die Komplikation der Hypothalamusinfarzierung durch Verlegung der A. hypothalamica bei der Technik des Fadenmodells zu vermeiden und dennoch einen verlässlichen permanenten Verschluss der A. cerebri media zu gewährleisten. Vergleichende Untersuchungen zwischen Makrosphären- und Fadenmodell konnten zeigen, dass ein Hypothalamusinfarkt durch die Verwendung von Makrosphären im permanenten

Okklusionsmodell grundsätzlich verhindert wird.[99] Somit kann mit Einsatz des Makrosphärenmodells die Übertragbarkeit der tierexperimentellen Ergebnisse auf den Menschen verbessert werden. Da die Kugeln jedoch frei mit dem Blutfluss in die basalen Gehirngefäße gespült werden, lässt sich deren Platzierung nicht genau bestimmen, so dass bei einer begrenzten Zahl an applizierten Makrosphären die Verlegung der A. cerebri media ausbleiben und lediglich ein Verschluss von beispielsweise A. cerebri anterior oder A. cerebri posterior erreicht werden kann, wie es auch in unserer Studie bei zwei von zehn Tieren der Fall war. Die Größen der Durchmesser der Makrosphären (mit Werten zwischen 0,315 und 0,355 mm) werden so gewählt, dass sie diejenigen der Gefäßdurchmesser deutlich übertreffen und demnach davon ausgegangen werden kann, dass ein vollständiger Gefäßverschluss ohne Restperfusion zwischen Makrosphäre und Gefäßwand entsteht.

## **2 Mikro-Computertomographie**

Während in der klinischen Anwendung verschiedene Methoden der Bildgebung wie die Mehrzeilen-CT, die Magnetresonanztomographie, die Angiographie oder der intravaskuläre Ultraschall für die Gefäßanalyse verfügbar sind, deren räumliche Auflösung jedoch kaum die Größenordnung von  $<500\ \mu\text{m}$  erreicht, sind histologische Untersuchungen nach wie vor der Goldstandard um Strukturen kleinerer Größenordnung, wie z.B. prä- und postkapilläre Blutgefäße, darzustellen und auszuwerten. Nachteilig ist bei histomorphometrischen Verfahren, dass nur einzelne Gefäßsegmente zur Untersuchung und Quantifizierung der Gefäßparameter herangezogen werden und anhand derer Rückschlüsse auf das gesamte Gefäß oder einen Gefäßabschnitt gezogen werden. Somit können beispielsweise Unregelmäßigkeiten einer Läsion oder Gefäßalterationen nicht zuverlässig erfasst werden. Des Weiteren können die Proben im Anschluss keinen anderen, zusätzlichen bildgebenden Untersuchungen unterzogen werden, da ihre Integrität durch die Aufbereitung für die Histomorphometrie zerstört wird. Eine weitere Einschränkung besteht in der Zweidimensionalität dieses Messverfahrens: die dreidimensionale Architektur der Gefäße kann nicht erfasst werden und kontinuierliche Messungen entlang der longitudinalen Achse sind nicht mehr durchführbar.

Mit der Entwicklung der Mikro-CT-Technik steht der vaskulären Bildgebung in der ex-vivo-Grundlagenforschung seit dem vergangenen Jahrzehnt ein zur konventionellen Histologie alternatives Verfahren zur Verfügung, welches eine vollständige, lückenlose Darstellung der Gefäßarchitektur bietet und die Analyse der Gefäßstrukturen und –volumina auf zwei- und dreidimensionaler Ebene ermöglicht.[110-112] In der

Vergleichsanalyse zur standardisierten Histomorphometrie, dem Goldstandard für die Darstellung und quantitative Analyse von Strukturen mit Größen  $< 200 \mu\text{m}$ , weist die Mikro-Computertomographie eine hoch signifikante Korrelation auf.[113] Proben können zerstörungsfrei dargestellt werden und somit uneingeschränkt weitere anschließende histologische Untersuchungen durchlaufen. Mithilfe der Mikro-CT-Technik, welche einen kontinuierlichen isotropen dreidimensionalen Datensatz erstellt, kann zusätzlich zur Gewebedifferenzierung auch die Kontrastmittelperfusion quantifiziert werden und somit Erkenntnisse über Gefäß- und Gewebedichte und Gefäßvolumina erzielt werden.

Nachdem die Mikro-CT-Technologie anfänglich primär bei der Untersuchung des spongiösen Knochens in der Osteoporoseforschung zur Anwendung kam [114], hat sich im Laufe der Zeit die Bandbreite der Einsatzbereiche deutlich erhöht. So wurden beispielsweise von Jorgensen et al. [115] erstmalig an fixierten Koronararterien von Schweinen nach Applikation von Microfil® die intramuralen Vasa Vasorum bei Voxelgrößen von 5 – 25  $\mu\text{m}$  dreidimensional dargestellt und die Architektur der Gefäße in dreidimensionalen Mikro-CT-Datensätzen quantifiziert. Ein weiterer Fortschritt gelang Wan und seinen Mitarbeitern, die mit Kontrastmittel perfundierte Koronararterien vom Rattenherz im Mikro-CT untersuchten [116]. Es gelang erstmals die vollständige Visualisierung und Analyse der dreidimensionalen Gefäßanatomie und Quantifizierung der Gefäßvolumina an Rattenkoronararterien.

Auch die Einführung neuer vaskulärer Kontrastmittel und alternativer Perfusionstechniken konnte einen bedeutenden Beitrag zur Fortentwicklung von Mikro-CT-Studien zur Gefäßanatomie leisten. Es wurde bereits in den 70er Jahren deutlich, dass sich Microfil® als Kontrastmittel zur kontinuierlichen und homogenen Perfusion von arteriellen Gefäßstrukturen sehr gut eignet. Bis heute kam Microfil® immer häufiger zum Einsatz und diente in verschiedenen Studien etwa zur Analyse der Vasa Vasorum von Koronargefäßen [117-121], der Nierenarterien [122-124], der arteriellen und portalvenösen Gefäßanatomie der Leber [125] oder der Pulmonalarterien [126]. Durch seine Bestandteile Blei und Silikon, welche in wässriger Lösung vorliegen, sind dem Microfil®-Kontrastmittel neben hydrophober Eigenschaften, welche der Penetration in den extravaskulären Raum vorbeugen, eine geringe Viskosität und ein damit verbundenes im Vergleich zu bariumsulfathaltigen Kontrastmitteln besseres Eindringen in kapilläre Gefäße gegeben.

Unsere Studie soll evaluieren, inwieweit die Mikro-Computertomographie mit der begleitenden Kontrastmittelperfusion mit Microfil® in der Lage ist Erkenntnisse über die Veränderungen der zerebrovaskulären Anatomie in den unterschiedlichen Ischämie-modellen des Rattengehirns zu erbringen und Vergleiche zu ermöglichen. Als Mittel zur nicht-invasiven Erforschung des arteriellen zerebrovaskulären Gefäßsystems

der Ratte wurde zunächst die hoch auflösende Magnet-Resonanz-Angiographie (MRA) eingeführt [56;127] und bis heute ist die Magnetresonanztomographie sowohl unter experimentellen [128;129] als auch unter klinischen Bedingungen [130;131] die am häufigsten verwendete Methode zur Untersuchung der zerebralen Perfusion. Genutzt werden hier experimentell und klinisch 3, 4.7, 7 und 11.7 Tesla-Systeme [132-136]. Die bedeutendste Einschränkung bei der Anwendung der MRT-Bildgebung stellt jedoch die räumliche Auflösung dar, welche nötig ist um die Veränderungen von Mikrovaskulatur zu visualisieren und quantifizieren. Die Mikro-Computertomographie ermöglicht die Überwindung dieser Schwierigkeiten mit seiner Fähigkeit zur Darstellung einer kompletten dreidimensionalen Gefäßarchitektur in mikroskopischem Detail. In der vorliegenden Arbeit stellt sich die Mikro-Computertomographie als eine sensitive Technik zur Erfassung von Gefäßalterationen in den unterschiedlichen Modellen zur fokalen zerebralen Ischämie heraus. Gegenüber der zweidimensionalen Histologie zeigen die dreidimensionalen Mikro-CT-Bilder den entscheidenden Vorteil, dass einzelne Gefäße entlang ihrer kompletten Länge eindeutig verfolgt und identifiziert werden können. In der vorliegenden Arbeit konnten die zerebralen Gefäße unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen vollständig dreidimensional dargestellt werden. Komplikationen wie das Auftreten einer Subarachnoidalblutung oder die Fehlverteilung von Makrosphären konnten detektiert und die betroffenen Gehirne somit für den Ausschluss von weiteren Messungen bestimmt werden. Die quantitative Bildanalyse konnte bei beiden Ischämie-Modellen anhand der veränderten Grauwerte und vaskulären Volumenanteile die fokale Minderperfusion im Perfusionsgebiet der A. cerebri media bestätigen. Dabei sind die verminderten Grauwerte auf die Entstehung eines Infarktödems zurückzuführen.[137] Die aktuellen Daten weisen jedoch darauf hin, dass beide Modelle zur permanenten Gefäßokklusion den Blutfluss zum Perfusionsgebiet der A. cerebri media nicht vollständig blockieren. Dies stimmt mit vorhergehenden Studien überein, welche mittels Laser-Doppler-Messungen während des Okklusionsprozesses beim Fadenmodell feststellen konnten, dass der Blutfluss im Perfusionsgebiet der A. cerebri media nicht auf Null fällt, sondern sich typischerweise von 70 auf 90 % reduziert.[53]

### **3 Nano-Computertomographie**

Mit der neuen Nano-CT-Technologie lassen sich Aufnahmen mit einer Detailerkennung von bis zu 120 nm analysieren. Bisher existieren nur sehr wenige Studien zur Gefäßanalyse mittels Nano-Computertomographie, da diese neue Technologie für die biomedizinische Forschung bis dato nur sehr begrenzt verfügbar ist.

Anhand der Nano-CT-Bildgebung gelang es uns zum ersten Mal die morphologische Grundlage der unvollständigen Blockierung des Blutflusses in den beiden permanenten Okklusionsmodellen zu veranschaulichen. Zunächst zeigte sich in beiden Modellen ein kollateraler Blutfluss über eine Distanz von der kontralateralen Hemisphäre ausgehend, am wahrscheinlichsten über Gefäßverbindungen zwischen der ipsilateralen und contralateralen A. cerebri anterior. Des Weiteren ließ sich ein lokaler kollateraler Blutfluss in der nahen Umgebung des Gefäß-Okkluders feststellen, der sich unerwartet sowohl beim Modell der Makrosphären als auch bei der Fadentechnik fand. Vor allem in den Aufnahmen des Makrosphärenmodells wurden kleine Kollateralgefäße deutlich, welche Blut über eine kurze Distanz vom proximalen zum distalen Segment der okkludierten A. cerebri media transportieren. Diese Erscheinung war bei dem Fadenmodell weitaus weniger offensichtlich, da hier der Faden die A. carotis interna über ihre gesamte Länge blockiert, wodurch der lokale kollaterale Blutfluss behindert wird. Weiterhin gelang mit Analyse der Nano-CT-Bildgebung der Nachweis der unbeabsichtigten Restperfusion zwischen dem Okkluder und dem zu verschließenden Gefäß im Fadenmodell. Diese Beobachtung ist sehr wahrscheinlich auf eine Diskrepanz zwischen Fadendurchmesser und Gefäßkaliber zurückzuführen. Vorangehende Studien von Elsaesser et al. [53] konnten aufzeigen, dass die Verwendung kleinerer Fäden einen höheren Anteil unzureichender Verschlüsse der A. cerebri media zur Folge hat. Eine weitere Unterstützung findet diese Hypothese in den Untersuchungen von Laing et al. [58], welche feststellten, dass silikonbeschichtete, und somit dickere Filamente für den Gefäßverschluss eine stärker ausgeprägte Ischämie gewährleisten als unbeschichtete Fäden. Der Gebrauch dickerer Fäden als die beschichteten 4–0 Filamente scheint dennoch nicht praktikabel, da ihr Einführen in die Schädelbasis sehr diffizil ist. Im Makrosphärenmodell hingegen konnte keine Restperfusion zwischen Makrosphären und Gefäßwand detektiert werden.

Für die Gefäßanatomie der Ratte werden ausgedehnte Anastomosen entlang der terminalen Äste der drei großen zerebralen Arterien beschrieben, welche zwischen A. cerebri media und A. cerebri anterior sowie zwischen A. cerebri media und A. cerebri posterior am stärksten ausgeprägt sind.[138-140] Die Mikro- und Nano-CT-Bildgebung legt dar, dass die kollateralen Verbindungen zum kortikalen Gefäßbett teilweise den kompletten Gefäßverschluss abwenden können und in eindeutigem Bezug zu dem durch Makrosphären okkludierten Perfusionsgebiet stehen. Diese Befunde stimmen mit der bestehenden Literatur überein, hinweisend auf präexistente Anastomosen und Kollateralen nach Okklusion der A. cerebri media der Ratte.[141-143]

Unsere Studie stellt einen methodologischen Ansatz zur erhaltenden Darstellung und Analyse des zerebralen Gefäßsystems unter physiologischen und pathologischen

Bedingungen dar, erstmals werden Mikro- und Nano-CT-Technologie für die nicht-destruktive Visualisierung der intrazerebralen Blutgefäße in verschiedenen Modellen zur fokalen zerebralen Ischämie genutzt.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass die bestehenden Modelle zum permanenten Verschluss der A. cerebri media zu einem gewissen Grad eine Restperfusion erlauben – einerseits via kollateraler Umwege und im Fall des Fadenmodells zusätzlich durch unbeabsichtigte Umgehungsperfusion entlang des Fadens im Gefäß. Sie stützen die These, dass mit den gegenwärtigen Nager-Schlaganfallmodellen keine unverfälschten permanenten ischämischen Umstände simuliert werden können, da sie jeweils ein Maß an Restperfusion beinhalten.

#### **4 Limitationen**

Obwohl die Mikro-CT in der vorgestellten Arbeit ihre Wertigkeit bei der Quantifizierung von Gefäßstrukturen demonstrieren konnte, birgt die Verwendung der Mikro-CT zwei große Nachteile. Ein Nachteil dieser Methode ist nach wie vor die Begrenzung des Messfeldes auf kleine Volumina, je nach Auflösung von einigen mm<sup>3</sup> bis zu wenigen cm<sup>3</sup>. Überdies ist derzeit ist die Auflösung durch die Zahl der Pixel der CCD-Kamera noch limitiert (1024x1024), so dass eine Auflösung von nur etwa einem Tausendstel des größten Objektdurchmessers in der Ebene senkrecht zur Drehachse der Probe erreicht werden kann.

Ein weiterer Nachteil liegt in der Notwendigkeit der Kontrastmittelapplikation, um eine Kontrastverstärkung und damit eine bessere Gewebedifferenzierung zu erreichen. Zahlreiche Untersuchungen haben sich mit Perfusionstechniken beschäftigt und dabei gezeigt, dass eine vollständige und lückenlose Gefäßperfusion durch verschiedene Perfusionstechniken nicht immer möglich ist.[144-151]

# V ZUSAMMENFASSUNG

## 1 Deutsch

In der Schlaganfallforschung spielen Tiermodelle zur fokalen zerebralen Ischämie eine unabdingbare Rolle. Die vorliegende Arbeit soll dazu dienen, die zerebrale makro- und mikrovaskuläre Architektur der Ratte in zwei unterschiedlichen Modellen zum permanenten Verschluss der A. cerebri media mittels der innovativen quantitativen Mikro- und Nano-CT-Technologie zu evaluieren und zu vergleichen.

Die Ratten wurden mithilfe der Makrosphärenmethode bzw. der Fadentechnik einer vierstündigen Okklusion der A. cerebri media unterzogen. Anschließend erfolgte nach Kontrastmittelperfusion der Zerebralgefäße die Isolation der Gehirne, welche mittels Mikro-CT oder Nano-CT (8  $\mu\text{m}^3$  bzw. 500  $\text{nm}^3$  Voxelgröße) en bloc gescannt wurden um dreidimensionale Bilder des vollständigen zerebralen Gefäßsystems zu erzeugen. Weiterhin wurde der arterielle vaskuläre Volumenanteil und die Grauwertabschwächung ermittelt und die Signifikanz der gemessenen Unterschiede mit der Abweichungsanalyse geprüft.

Die Mikro-CT-Bildgebung erbrachte eindeutige quantitative Informationen zur vaskulären Morphologie der Zerebralgefäße. Mikro- und Nano-CT konnten ihr Potential zur Visualisierung und Differenzierung des Gebietes des Gefäßverschlusses in beiden Ischämie modellen nachweisen. Das Fadenmodell resultierte in einem deutlichen Abfall des vaskulären Volumenanteils im Perfusionsgebiet der A. cerebri media. Vergleichbar zum Fadenmodell sank auch bei Okklusion der A. cerebri media durch Makrosphären der vaskuläre Volumenanteil der betroffenen Hemisphäre unabhängig von der Anzahl der Makrosphären signifikant ab ( $p < 0,001$ ). Anhand der erstellten Grauwert-Messungen konnten die fokalen ischämischen Läsionen radiographisch eingestuft werden ( $p < 0,0001$ ). Die Nano-CT-Bildgebung zeigte nach Makrosphären-Perfusion eine Kollateralperfusion im Zusammenhang mit den jeweiligen Arealen der okkludierten Gefäße auf.

In der vorliegenden Arbeit konnten somit erstmals Mikro- und Nano-CT-Bildgebung der qualitativen und quantitativen Darstellung und Analyse der zerebralen Gefäßveränderungen in unterschiedlichen Modellen der fokalen zerebralen Ischämie der Ratte dienen und überdies ihre Kompetenz zur präzisen Visualisierung und Differenzierung der morphologischen Alterationen in beiden Modellen beweisen.

## 2 Englisch

Animal models of focal cerebral ischemia are widely used in stroke research. The purpose of our study was to evaluate and compare the cerebral macro- and microvascular architecture of rats in two different models of permanent middle cerebral artery occlusion using an innovative quantitative micro- and nano-CT imaging technique.

Four hours of middle cerebral artery occlusion was performed in rats using the macrosphere method or the suture technique. After contrast perfusion, brains were isolated and scanned en-bloc using micro-CT ( $8\mu\text{m}$ )<sup>3</sup> or nano-CT at  $500\text{nm}$ <sup>3</sup> voxel size to generate 3D images of the cerebral vasculature. The arterial vascular volume fraction and gray scale attenuation was determined and the significance of differences in measurements was tested with analysis of variance [ANOVA].

Micro-CT provided quantitative information on vascular morphology. Micro- and nano-CT proved to visualize and differentiate vascular occlusion territories performed in both models of cerebral ischemia. The suture technique leads to a remarkable decrease in the intravascular volume fraction of the middle cerebral artery perfusion territory. Blocking the medial cerebral artery with macrospheres, the vascular volume fraction of the involved hemisphere decreased significantly ( $p < 0.001$ ), independently of the number of macrospheres, and was comparable to the suture method. We established gray scale measurements by which focal cerebral ischemia could be radiographically categorized ( $p < 0.001$ ). Nano-CT imaging demonstrates collateral perfusion related to different occluded vessel territories after macrosphere perfusion.

Micro- and Nano-CT imaging is feasible for analysis and differentiation of different models of focal cerebral ischemia in rats.

# VI ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

## 1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pathogenese ischämischer Schlaganfälle in Deutschland .....	3
Abb. 2: Schlaganfallrisiko nach TIA.....	4
Abb. 3: Penumbra-Konzept.....	6
Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der postischämischen Schädigungskaskade.....	7
Abb. 5: Vereinfachte Übersicht der pathophysiologischen Mechanismen und Wege zum ischämischen Zelltod.....	10
Abb. 6: Schematische Darstellung der bedeutenden zerebralen Arterien bei Mensch und Ratte.....	16
Abb. 7: Schema-Darstellung der Mikro-CT-Technik mit Kegelstrahlgeometrie.....	19
Abb. 8: Makroskopische Photographie eines Kontrollgehirns nach Kontrastmittelperfusion.....	28
Abb. 9: Zerebrale Gefäße der Ratte von kaudal in der Volumenrekonstruktion nach Segmentierung der Gefäße im Mikro-CT-Bild.....	29
Abb. 10: Zerebrale Gefäße der Ratte von kranial in der Volumenrekonstruktion nach Gefäßsegmentierung im Mikro-CT-Bild.....	30
Abb. 11: Mikro-CT-Einzelschnitte des Rattengehirns in verschiedenen Ebenen.....	31
Abb. 12: Mikro-CT-Darstellung des permanenten Fadenmodells nach Kontrastmittelperfusion.....	33
Abb. 13: Mikro-CT-Darstellung des Fadenmodells nach Entfernen des Fadens und Kontrastmittelperfusion.....	34
Abb. 14: Mikro-CT-Darstellung des Makrosphärenmodells nach Kontrastmittelperfusion.....	36
Abb. 15: Nano-CT-Bildgebung im Fadenmodell nach Kontrastmittelperfusion.....	38
Abb. 16: Mikro-CT- und Nano-CT-Aufnahmen des Makrosphärenmodells: Darstellung von Kollateralen.....	39
Abb. 17: Mikro-CT- und Nano-CT-Aufnahmen des Makrosphärenmodells: Darstellung von Kollateralen und unvollständigem Gefäßverschluss.....	40
Abb. 18: Vergleich des vaskulären Volumenanteils bei Tieren des Makrosphären- und Fadenmodells.....	43
Abb. 19: Makrosphärenmodell – Vaskuläre Volumenanteile bei verschiedenen Makrosphären-Perfusionsgebieten im Vergleich zu Kontrollen.....	44
Abb. 20: Unterschiede der Grauwertverteilungen im Perfusionsgebiet der A. cerebri media beim Faden- und Makrosphärenmodell.....	45

## 2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Blutflussschwellenwerte bei zerebraler Ischämie.....	5
Tab. 2: Vergleich charakteristischer Parameter von Mikro-CT-Geräten und klinischen Spiral-CT-Scannern.....	21
Tab. 3: Vergleich von vaskulärer Volumina und Gefäßdurchmesser für Faden- und Makrosphärenmodell.....	42

## VII LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams HP, Gordon DL (1991) Epidemiology of and stroke-preventive strategies for atherothromboembolic brain infarction in the elderly. *Clin Geriatr Med* 7: 401-416
2. Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein GZ (1996) The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 20: 445-452
3. Astrup J, Siesjo BK, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12: 723-725
4. Balzer K, Dresch W, Frommelt P (2005) Leitlinien-Clearingbericht Schlaganfall, äzq Schriftenreihe. Ideel Verlag Ohg,
5. Beighley PE, Thomas PJ, Jorgensen SM, Ritman EL (1997) 3D architecture of myocardial microcirculation in intact rat heart: a study with micro-CT. *Adv Exp Med Biol* 430: 165-175
6. Bernstein MA, Huston J, Lin C, Gibbs GF, Felmlee JP (2001) High-resolution intracranial and cervical MRA at 3.0T: technical considerations and initial experience. *Magn Reson Med* 46: 955-962
7. Block F, Schwarz M (1999) [Neuroprotection in stroke. A critical overview]. *Nervenarzt* 70: 101-110
8. Bogousslavsky J, Cachin C, Regli F, Despland PA, van Melle G, Kappenberger L (1991) Cardiac sources of embolism and cerebral infarction--clinical consequences and vascular concomitants: the Lausanne Stroke Registry. *Neurology* 41: 855-859
9. Bonse U, Busch F (1996) X-ray computed microtomography (microCT) using synchrotron radiation (SR). *Prog Biophys Mol Biol* 65: 133-169
10. Bradley R (1972) The post-mortem fixation of farm animals by vascular perfusion. *Res Vet Sci* 13: 579-588
11. Brown JO (1966) The morphology of circulus arteriosus cerebri in rats. *Anat Rec* 156: 99-06
12. Burstein P, Björkholm PJ, Chase RC, Seguin FH (1984) The largest and the smallest X-ray computed tomography systems. *Nucl Instrum Methods Phys Res* 221: 207-212
13. Cnudde V, Masschaele B, Dierick M, Vlassenbroeck J, Van Hoorebeke L, Jacobs P (2006) Recent progress in X-ray CT as a geosciences tool. *Geochemistry* 21: 826-832
14. Coyle P (1982) Middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Stroke* 13: 855-859
15. Coyle P (1986) Cerebral collateral patterns in normal Wistar rats. *Acta Physiol Scand Suppl* 552: 5-8
16. Coyle P (1987) Dorsal cerebral collaterals of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) and Wistar Kyoto rats (WKY). *Anat Rec* 218: 40-44

17. Coyle P (1987) Spatial relations of dorsal anastomoses and lesion border after middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 18: 1133-1140
18. Coyle P, Heistad DD (1987) Blood flow through cerebral collateral vessels one month after middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 18: 407-411
19. Coyle P, Jokelainen PT (1982) Dorsal cerebral arterial collaterals of the rat. *Anat Rec* 203: 397-404
20. Daffertshofer M, Mielke O, Pullwitt A, Felsenstein M, Hennerici M (2004) Transient ischemic attacks are more than "ministrokes". *Stroke* 35: 2453-2458
21. Daneyemez M (1999) Silicone rubber microangiography of injured acute spinal cord after treatment with methylprednisolone and vitamin E in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 24: 2201-2205
22. Diepen R (1962) Blutversorgung und Angioarchitektonik des Hypothalamus. In: Wilhelm Möllendorf WB (ed) *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Teil 7: Der Hypothalamus*. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, pp 178-181
23. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391-397
24. Dover SD, Elliott JC, Boakes R, Bowen DK (1989) Three-dimensional X-ray microscopy with accurate registration of tomographic sections. *J Microsc* 153: 187-191
25. Dubinsky JM (1993) Examination of the role of calcium in neuronal death. *Ann N Y Acad Sci* 679: 34-42
26. Elliott JC, Dover SD (1982) X-ray microtomography. *J Microsc* 126: 211-213
27. Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W (1999) [Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure]. *Radiologe* 39: 203-212
28. Eschenfelder Ch C, Zeller JA, Stingele R (2006) [Stroke: causes and classification]. *Hamostaseologie* 26: 298-308
29. Feldkamp LA (1984) Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Amer* 1: 612-619
30. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M (1989) The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 4: 3-1
31. Fortepiani LA, Ruiz MC, Passardi F, Bentley MD, Garcia-Estan J, Ritman EL, Romero JC (2003) Effect of losartan on renal microvasculature during chronic inhibition of nitric oxide visualized by micro-CT. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F852-F860
32. Frederik PM, van Doorn LG (1973) A technique for perfusion of rat testes in situ through the internal spermatic arteries. *J Reprod Fertil* 35: 117-121
33. Gahn G (2009) [Stroke and atrial fibrillation]. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* 20: 70-72

34. Garcia-Sanz A, Rodriguez-Barbero A, Bentley MD, Ritman EL, Romero JC (1998) Three-dimensional microcomputed tomography of renal vasculature in rats. *Hypertension* 31: 440-444
35. Gerriets T, Li F, Silva MD, Meng X, Brevard M, Sotak CH, Fisher M (2003) The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Methods* 122: 201-211
36. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Kaps M, Bachmann G, Fisher M (2003) Neuroprotective effects of MK-801 in different rat stroke models for permanent middle cerebral artery occlusion: adverse effects of hypothalamic damage and strategies for its avoidance. *Stroke* 34: 2234-2239
37. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M, Bachmann G (2004) Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke* 35: 566-571
38. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Kluge A, Kaps M, Fisher M, Bachmann G (2004) Middle cerebral artery occlusion during MR-imaging: investigation of the hyperacute phase of stroke using a new in-bore occlusion model in rats. *Brain Res Brain Res Protoc* 12: 137-143
39. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Rottger C, Kluge A, Kaps M, Fisher M, Bachmann G (2004) Complications and pitfalls in rat stroke models for middle cerebral artery occlusion: a comparison between the suture and the macrosphere model using magnetic resonance angiography. *Stroke* 35: 2372-2377
40. Ginsberg MD, Busto R (1989) Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20: 1627-1642
41. Glover PM, Bowtell RW, Brown GD, Mansfield P (1994) A microscope slide probe for high resolution imaging at 11.7 Tesla. *Magn Reson Med* 31: 423-428
42. Gong C, Qin Z, Betz AL, Liu XH, Yang GY (1998) Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 801: 1-8
43. Haddad WS, McNulty I, Trebes JE, Anderson EH, Levesque RA, Yang L (1994) Ultrahigh-Resolution X-ray Tomography [Record Supplied By Publisher]. *Science* 266: 1213-1215
44. Hamann GF (1997) [Acute cerebral infarct: physiopathology and modern therapeutic concepts]. *Radiologe* 37: 843-852
45. Handschu R, Fateh-Moghadam S, Klotz E, Schmid A, Stemper B, Heckmann JG, Huk WJ, Neundorfer B, Tomandl BF (2004) [Multimodal computed tomography in acute cerebral infarction. Experience with a standardized protocol in 100 patients]. *Nervenarzt* 75: 564-576
46. Heger W, Kaden F, Mittmann U, Schmier J (1976) [Injection methods for the demonstration of the coronary arterial vasculature (author's transl)]. *Basic Res Cardiol* 71: 103-112

47. Hill MD, Yiannakoulias N, Jeerakathil T, Tu JV, Svenson LW, Schopflocher DP (2004) The high risk of stroke immediately after transient ischemic attack: a population-based study. *Neurology* 62: 2015-2020
48. Jorgensen SM, Demirkaya O, Ritman EL (1998) Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT. *Am J Physiol* 275: H1103-H1114
49. Kantor B, Jorgensen SM, Lund PE, Chmelik MS, Reyes DA, Ritman EL (2002) Cryostatic micro-computed tomography imaging of arterial wall perfusion. *Scanning* 24: 186-190
50. Karau KL, Johnson RH, Molthen RC, Dhyani AH, Haworth ST, Hanger CC, Roerig DL, Dawson CA (2001) Microfocal X-ray CT imaging and pulmonary arterial distensibility in excised rat lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1447-H1457
51. Kawamura S, Yasui N, Shirasawa M, Fukasawa H (1991) Rat middle cerebral artery occlusion using an intraluminal thread technique. *Acta Neurochir (Wien)* 109: 126-132
52. Khaw AV, Kessler C (2006) [Stroke: epidemiology, risk factors, and genetics]. *Hamostaseologie* 26: 287-297
53. Kohno K, Back T, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA (1995) A modified rat model of middle cerebral artery thread occlusion under electrophysiological control for magnetic resonance investigations. *Magn Reson Imaging* 13: 65-71
54. Koizumi J YY, Nakazawa T, Ooneda G (1986) Experimental studies of ischemic brain edema. I: 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
55. Kratky RG, Zeindler CM, Lo DK, Roach MR (1989) Quantitative measurement from vascular casts. *Scanning Microsc* 3: 937-3
56. Kucinski T, Fiehler J, Zeumer H (2005) Bildgebung und Pathophysiologie des frühen ischämischen Ödems beim akuten Schlaganfall. *Clin Neuroradiol* 15: 163-173
57. Kuge Y, Minematsu K, Yamaguchi T, Miyake Y (1995) Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 26: 1655-1658
58. von Kummer R, Allen KL, Holle R, Bozzao L, Bastianello S, Manelfe C, Bluhmki E, Ringleb P, Meier DH, Hacke W (1997) Acute stroke: usefulness of early CT findings before thrombolytic therapy. *Radiology* 205: 327-333
59. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, McKenna C, Holmes DR, Schwartz RS, Lerman A (1998) Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 101: 1551-1556
60. Laing RJ, Jakubowski J, Laing RW (1993) Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best? *Stroke* 24: 294-298

61. Langheinrich AC, Bohle RM, Greschus S, Hackstein N, Walker G, von Gerlach S, Rau WS, Holschermann H (2004) Atherosclerotic lesions at micro CT: feasibility for analysis of coronary artery wall in autopsy specimens. *Radiology* 231: 675-681
62. Lee RM (1995) Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther* 66: 149-173
63. Lerman A, Ritman EL (1999) Evaluation of microvascular anatomy by micro-CT. *Herz* 24: 531-533
64. Lindsberg PJ, Hallenbeck JM, Feuerstein G (1991) Platelet-activating factor in stroke and brain injury. *Ann Neurol* 30: 117-129
65. Li F, Omae T, Fisher M (1999) Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke* 30: 2464-1
66. Li Y, Chopp M, Jiang N, Yao F, Zaloga C (1995) Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 389-397
67. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4: 399-415
68. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91
69. McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA, Hynynen K (2004) MRI investigation of the threshold for thermally induced blood-brain barrier disruption and brain tissue damage in the rabbit brain. *Magn Reson Med* 51: 913-923
70. Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK (1992) Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Brain Res* 89: 67-78
71. Memezawa H, Zhao Q, Smith ML, Siesjo BK (1995) Hyperthermia nullifies the ameliorating effect of dizocilpine maleate (MK-801) in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 670: 48-52
72. Moffat DB (1961) The development of the anterior cerebral artery and its related vessels in the rat. *Am J Anat* 108: 17-29
73. Moffat DB (1961) The development of the posterior cerebral artery. *J Anat* 95: 485-494
74. Nettum JA (1995) Combined vascular-bronchoalveolar casting using formalin-fixed canine lungs and a low viscosity silicone rubber. *Anat Rec* 243: 479-482
75. Neudeck LD, Fournier DJ (1980) A simple technique for silicone rubber perfusion of the microcirculation of the mouse kidney. *Lab Anim Sci* 30: 209-211
76. Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1992) Zentralnervensystem. In: Böhme G (ed) Nickel, Schummer, Seiferle: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV: Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, pp 28-221

77. Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1992) Zentralnervensystem. In: Böhme G (ed) Nickel, Schummer, Seiferle: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV: Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, pp 2-375
78. Nilsson P, Sandberg-Wollheim M, Norrving B, Larsson EM (2007) The role of MRI of the brain and spinal cord, and CSF examination for the diagnosis of primary progressive multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 14: 1292-1295
79. Ortiz MC, Garcia-Sanz A, Bentley MD, Fortepiani LA, Garcia-Estan J, Ritman EL, Romero JC, Juncos LA (2000) Microcomputed tomography of kidneys following chronic bile duct ligation. *Kidney Int* 58: 1632-1640
80. Pfeuffer J, Adriany G, Shmuel A, Yacoub E, Van De Moortele PF, Hu X, Ugurbil K (2002) Perfusion-based high-resolution functional imaging in the human brain at 7 Tesla. *Magn Reson Med* 47: 903-911
81. Rabb CH (1996) Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 27: 151
82. Reese T, Bochelen D, Sauter A, Beckmann N, Rudin M (1999) Magnetic resonance angiography of the rat cerebrovascular system without the use of contrast agents. *NMR Biomed* 12: 189-196
83. Ritman EL (2002) Molecular imaging in small animals--roles for micro-CT. *J Cell Biochem Suppl* 39: 116-124
84. Ritman EL (2004) Micro-computed tomography-current status and developments. *Annu Rev Biomed Eng* 6: 185-208
85. Ritman EL, Bolander ME, Fitzpatrick LA, Turner RT (1998) Micro-CT imaging of structure-to-function relationship of bone microstructure and associated vascular involvement. *Technol Health Care* 6: 403-412
86. Roth H (2006) Computertomographie in der Elektronik. *Elektronik und Entwicklung* 5: 62
87. Rother J (2000) ["Spreading depression" and peri-infarct depolarizations. Relevant pathological events in migraine and stroke?]. *Nervenarzt* 71: 84-90
88. Rother J, de Crespigny AJ, D'Arceuil H, Mosley ME (1996) MR detection of cortical spreading depression immediately after focal ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 214-220
89. Rother J, Waggle K, van Bruggen N, de Crespigny AJ, Moseley ME (1996) Experimental cerebral venous thrombosis: evaluation using magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 1353-1361
90. Roussel SA, van Bruggen N, King MD, Houseman J, Williams SR, Gadian DG (1994) Monitoring the initial expansion of focal ischaemic changes by diffusion-weighted MRI using a remote controlled method of occlusion. *NMR Biomed* 7: 21-28
91. Sato T, Chieda O, Yamakashi Y, Tsubouchi M (1981) X-ray tomography for microstructural objects. *Appl Opt* 20: 3880-3
92. Saver JL (2006) Time is brain--quantified. *Stroke* 37: 263-266

93. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ (1998) A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* 29: 2162-2170
94. Scremin O (1995) Cerebral vascular system. In: Paxinos G (ed) *The rat nervous system: second edition*. Academic Press, Sydney, Australien, pp 3-35
95. Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG, Gibson DG, Fisher M (1997) Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats. *J Neurol Sci* 153: 8-1
96. Töndury G, Kubik S (1987) Gestalt und Gliederung des Gehirns. In: Leonhardt H, Tillmann B, Töndury G, Zilles K (eds) *Rauber, Kopsch: Anatomie des Menschen Lehrbuch und Atlas, Band 3: Nervensystem und Sinnesorgane*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, pp 119-173
97. Töndury G, Kubik S, Krisch B (1987) Hirnhäute und Hirngefäße. In: Leonhardt H, Tillmann B, Töndury G, Zilles K (eds) *Rauber, Kopsch: Anatomie des Menschen Lehrbuch und Atlas, Band 3: Nervensystem und Sinnesorgane*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, pp 175-233
98. Trenkler J (2008) [Acute ischemic stroke. Diagnostic imaging and interventional options]. *Radiologe* 48: 457-473
99. Vernooij MW, Ikram MA, Tanghe HL, Vincent AJ, Hofman A, Krestin GP, Niessen WJ, Breteler MM, van der LA (2007) Incidental findings on brain MRI in the general population. *N Engl J Med* 357: 1821-1828
100. De Vita E, Thomas DL, Roberts S, Parkes HG, Turner R, Kinchesh P, Shmueli K, Yousry TA, Ordidge RJ (2003) High resolution MRI of the brain at 4.7 Tesla using fast spin echo imaging. *Br J Radiol* 76: 631-637
101. Wan SY, Kiraly AP, Ritman EL, Higgins WE (2000) Extraction of the hepatic vasculature in rats using 3-D micro-CT images. *IEEE Trans Med Imaging* 19: 964-971
102. Wan SY, Ritman EL, Higgins WE (2002) Multi-generational analysis and visualization of the vascular tree in 3D micro-CT images. *Comput Biol Med* 32: 55-71
103. Wan SY, Ritman EL, Higgins WE (2002) Multi-generational analysis and visualization of the vascular tree in 3D micro-CT images. *Comput Biol Med* 32: 55-71
104. Yonas H, Boehnke M, Wolfson S (1982) Radiopaque silicone rubber and xeroradiography for the high-resolution visualization of the cerebral vasculature. *Surg Neurol* 17: 130-131
105. Zhao Q, Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK (1994) Hyperthermia complicates middle cerebral artery occlusion induced by an intraluminal filament. *Brain Res* 649: 253-259
106. (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 333: 1581-1587

107. (1999) Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 30: 2752-2758

## VIII PUBLIKATIONEN

### **Originalarbeiten:**

Alexander C. Langheinrich, Mesut Yeniguen, **Anne Ostendorf**, Simone Marhoffer, Marian Kampschulte, Georg Bachmann, Erwin Stolz, Tibo Gerriets

**Evaluation of the Middle Cerebral Artery Occlusion Techniques in the Rat by in-vitro 3-Dimensional Micro- and Nano Computed Tomography.** (BMC Neurology, May 2010)

Alexander C. Langheinrich, Mesut Yeniguen, **Anne Ostendorf**, Simone Marhoffer, Christian Dierkes, Susanne von Gerlach, Marian Kampschulte, Georg Bachmann, Erwin Stolz, Tibo Gerriets

**In-vitro Evaluation of the Sinus Sagittalis Superior Thrombosis Model in the Rat using 3-D Micro- and Nano-Computed Tomography.** (Neuroradiology, Sept. 2009)

### **Abstracts:**

Alexander C. Langheinrich, Mesut Yeniguen, **Anne Ostendorf**, Simone Marhoffer, Clemens Müller, Marian Kampschulte, Georg Bachmann, Erwin Stolz, Tibo Gerriets

**Rat Stroke Models: Evaluation using 3D micro-CT.** Deutscher Röntgenkongress in Berlin, Mai 2009 (Vortrag und Posterpräsentation, **Posterpreis magna cum laude**)

Alexander C. Langheinrich, Mesut Yeniguen, **Anne Ostendorf**, Simone Marhoffer, Christian Dierkes, Susanne von Gerlach, Marian Kampschulte, Georg Bachmann, Erwin Stolz, Tibo Gerriets

**In-vitro Evaluation of the Sinus Sagittalis Superior Thrombosis Model in the Rat using 3-D Micro- and Nano-Computed Tomography.** SkyScan User Meeting in Ghent, April 2009 (Vortrag)

## IX ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **X DANKSAGUNG**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. A. C. Langheinrich gilt mein ganz besonderer Dank für die Vergabe dieses interessanten Themas, die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit, die intensive fachkundige Betreuung und großzügige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei Herrn Mesut Yeniguen und der Arbeitsgruppe „Experimentelle Neurologie“ der Neurologischen Klinik der JLU Gießen in Zusammenarbeit mit der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim bedanke ich mich für die Unterstützung bei dem experimentellen Teil der Arbeit.

Frau Gunhild Martels aus dem Zentrum für Diagnostische Radiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die zügige und zuverlässige Bearbeitung der Proben am Mikro- und Nano-Computertomographen sowie für die zahl- und hilfreichen Ideen bei deren Auswertung.

Meiner Familie und meinen Freunden bin ich für ihre beständige und bereitwillige Unterstützung, ihre unermüdliche Motivation und die belebenden Ablenkungen während der Erstellung dieser Arbeit und des gesamten Studiums ganz besonders dankbar.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**