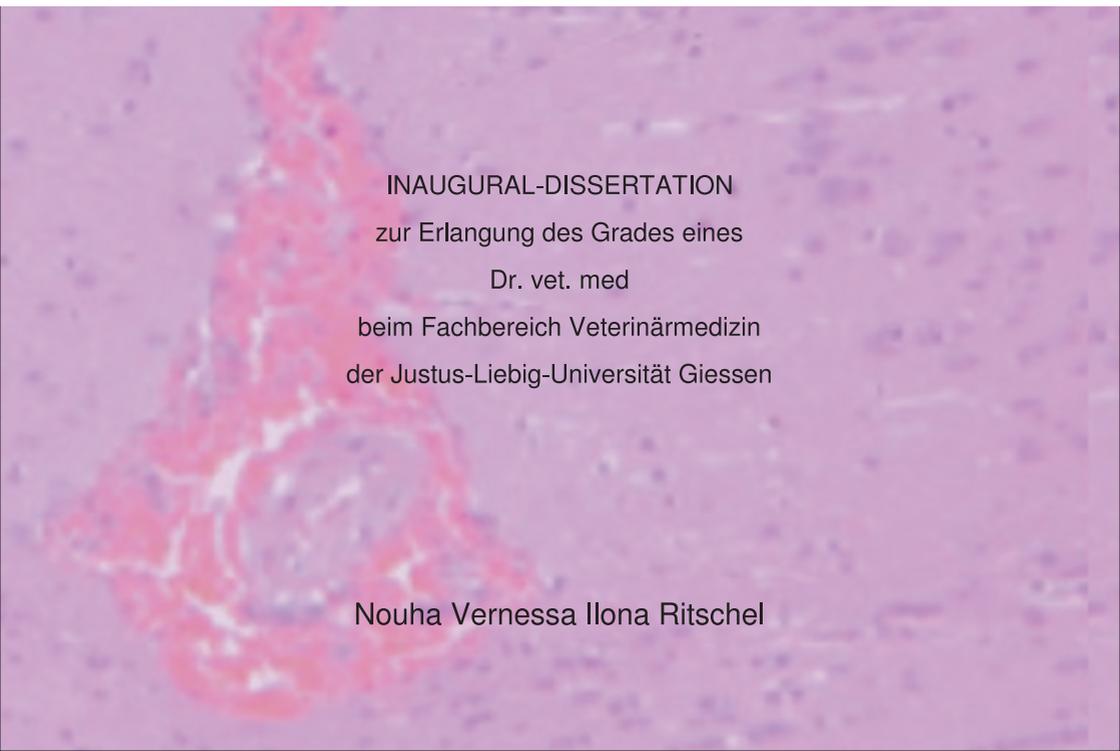


**Sicherheit und Effizienz
innovativer Ultraschallverfahren
zur Therapie des akuten Hirninfarktes
im Rattenmodell**



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

Nouha Vernessa Ilona Ritschel

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2011

© 2011 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,**
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-057-1

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. J. Roth

und

der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Giessen und Marburg

Betreuer: Prof. Dr. M. Nedelmann

Sicherheit und Effizienz innovativer Ultraschallverfahren zur Therapie des akuten Hirninfarktes im Rattenmodell

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von

Nouha Vernessa Ilona Ritschel

Tierärztin aus Kuwait

Giessen 2011

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

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

Gutachter: Prof. Dr. J. Roth

Prof. Dr. M. Nedelmann

Tag der Disputation: 28.10.2011

Meinen Eltern und Michael

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	5
II.	Übersicht	9
2.1.	Einsatz von Nagern in der experimentellen Schlaganfallforschung	9
2.2.	Vergleichende Anatomie des Gehirns von Ratte und Mensch	10
2.2.1.	Allgemeine Anatomie	10
2.2.2.	Extrakranielle Gefäßversorgung	10
2.2.3.	Intrakranielle Gefäßversorgung	11
2.3.	Pathogenese des Schlaganfalls	12
2.3.1.	Stenosen	13
2.3.2.	Thrombusbildung und Emboliegenese	14
2.3.3.	Dynamik der Thromben	14
2.3.4.	Interventionsmöglichkeiten	16
2.4.	Pathophysiologie des Schlaganfalls	17
2.4.1.	Infarktkern und Penumbra	17
2.4.2.	Die postischämische Kaskade.....	18
2.4.3.	Ödembildung	20
2.5.	Technik zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien an der Ratte	21
2.6.	Neurologischer Status	22
2.7.	Die Kernspintomographie	23
2.7.1.	Physikalische Grundlagen	23
2.7.2.	Technische Grundlagen der Bildgebung	24
2.7.3.	Darstellung von infarziertem Gewebe	25
2.7.4.	Die MRT-Morphologie des Rattengehirns anhand einer T2-gewichtete Bildgebung	26
2.8.	Die Ultraschalltechnologie	27
2.8.1.	Physikalische Grundlagen	27
2.8.2.	Technische Grundlagen	29
2.8.3.	Technische Anwendungen	29

2.8.4.	Biologische Wirkungen	31
III.	Zielsetzung	33
IV.	Material und Methodik	36
4.1.	Materialien	36
4.1.1.	Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel	36
4.1.2.	Medikamente	36
4.1.3.	Operationszubehör	37
4.1.4.	Versuchstiere	38
4.1.5.	Geräte	38
4.1.6.	Hard- und Software	39
4.1.7.	Magnetresonanztomographie.....	39
4.1.8.	Gewebeuntersuchung	39
4.2.	Methodik	40
4.2.1.	Versuchstiere	40
4.2.2.	Narkose	40
4.2.3.	Operationstechniken	40
4.2.4.	Vorbereitung für 60 kHz-Beschallung.....	41
4.2.5.	Einstellungen des 60 kHz-Gerätes	42
4.2.6.	Vorbereitung für 3 MHz-Beschallung.....	43
4.2.7.	Einstellungen des 3 MHz-Gerätes.....	43
4.2.8.	Testsubstanzen und Applikationsart.....	44
4.2.9.	Physiologische Parameter	45
4.2.10.	Zerebrale Temperatur	45
4.2.11.	MRT-Technik.....	46
4.2.12.	Computergestützte Auswertung	50
4.2.13.	Klinisch-neurologische Beurteilung	53
4.2.14.	Postmortale Untersuchungsmethoden	57
4.2.15.	Probenaufbereitung für 3D Micro- und Nano-CT-Bildgebung.....	59
4.2.16.	Bildgebung 3D Micro-CT	59
4.2.17.	Bildgebung 3D Nano-CT	60

4.3.	Studiendesign.....	61
4.3.1.	Experiment I: 60kHz-Thrombolyse	61
4.3.2.	Experiment II: 3MHz-Thrombolyse	65
4.3.3.	Experiment III: Zerebrale Temperaturentwicklung während 60 kHz-Beschallung.....	68
4.3.4.	Experiment IV: Zerebrale Temperaturentwicklung während 3 MHz-Beschallung.....	70
4.3.5.	Experiment V: Postmortale 3D Micro- und Nano-CT-Bildgebung nach 3 MHz-Beschallung	72
V.	Ergebnisse	75
1.	Experiment I: 60 kHz-Thrombolyse.....	75
1.1.	Gruppenbesetzung.....	75
1.2.	Physiologische Befunde	75
1.3.	Mortalitätsrate.....	75
1.4.	Post-mortem Befunde	77
1.5.	MRT Befunde	78
1.6.	Neurologische Befunde	82
2.	Experiment II: 3 MHz-Thrombolyse.....	85
2.1.	Gruppenbesetzung.....	85
2.2.	Physiologische Befunde	85
2.3.	Mortalitätsrate.....	85
2.4.	Post-Mortem-Befunde	85
2.5.	MRT-Befunde.....	86
2.6.	Neurologische Befunde	87
3.	Experiment III: Zerebrale Temperaturentwicklung während 60 kHz-Beschallung	90
4.	Experiment IV: Zerebrale Temperaturentwicklung während 3 MHz-Beschallung	91
5.	Experiment V: Bildgebung Micro- und Nano-CT nach 3 MHz-Beschallung	91
VI.	Diskussion	94
6.1.	Einleitung.....	94

6.2.	Evaluation potenzieller Nebenwirkungen spezifisch entwickelten 60 kHz-Ultraschalls	95
6.3.	Evaluation potenzieller Nebenwirkungen therapeutisch eingesetzten diagnostischen 3 MHz-Ultraschalls	97
6.3.1.	Therapeutischer Nutzen bei 3 MHz	99
6.4.	Schlussfolgerung	101
VII.	Zusammenfassung.....	103
VIII.	Summary.....	106
IX.	Abkürzungen	108
X.	Literaturverzeichnis	110
XI.	Anhang.....	122
11.1.	Publikationen.....	122
11.2.	Danksagung.....	124
11.3.	Erklärung	126

I. Einleitung

Der Schlaganfall ist mit 7,9% die dritthäufigste Todesursache in Deutschland¹⁴⁵. 24% der Betroffenen sterben innerhalb des ersten Monats und weitere 42% innerhalb eines Jahres²³. 15% der Erkrankten bedürfen einer Langzeitbetreuung nach einem Jahr²³. Der Schlaganfall ist damit die häufigste zur Invalidität führende Erkrankung und zählt in den Industrieländern zu den teuersten Krankheiten überhaupt¹⁶³.

Der akute Schlaganfall bezeichnet ein Syndrom, welches durch ein plötzlich einsetzendes, fokales zentralnervöses Defizit gekennzeichnet ist³⁶. Primär muss zwischen einer ischämischen (80-85%) und einer hämorrhagischen Genese (10-15%) unterschieden werden³⁶.

Der ischämische Schlaganfall entsteht infolge einer arteriellen Durchblutungsstörung des Gehirns¹²⁴. Es kommt dabei zu einem partiellen oder kompletten Gefäßverschluss^{10, 123}, welcher atherothrombotischen, kardioembolischen, mikro- oder makroangiopathischen Ursprungs sein kann oder durch tumorbedingte Gefäßkompressionen¹⁶³ zustande kommt. Zu den Risikofaktoren zählen neben der arteriellen Hypertonie und des Diabetes mellitus auch Störungen des Fettstoffwechsels sowie der Nikotinabusus¹⁸.

Als Ätiologie für hämorrhagische Insulte treten intrazerebrale Hämatome, subarachnoidale Blutungen sowie epi- und subdurale Hämatome auf.

Metabolische Entgleisungen, Kompressions syndrome oder auch psychogene Lähmungen kommen als Ursachen für Pseudo-Schlaganfälle nichtvaskulärer Ätiologie³⁶ in Frage.

Je nach betroffenem Hirnareal können unterschiedliche Schlaganfall-Symptome auftreten. Dazu zählen Hemiparese, Hypästhesie, Aphasie, Dysarthrie, Dysphagie, Sehstörungen, Vertigo, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Diplopie⁶².

Schlaganfallpatienten sind immer als medizinischer Notfall zu behandeln, wobei die Behandlung auf einer Schlaganfallstation (Stroke Unit) die Mortalität um 18-46% reduziert⁸⁶. Ein Bestandteil der Diagnostik eines Schlaganfalls ist neben der Anamnese und der Erhebung von klinischen Befunden die zerebrale Bildgebung. Der

direkte Nachweis eines Hirninfarktes und seiner Lokalisation erfolgt über ein zerebrales Computertomogramm oder ein Magnetresonanztomogramm^{37, 77}. Unter Verwendung dieser Techniken ist beispielsweise die Differenzierung zwischen einem ischämischen Schlaganfall und einer Hirnblutung möglich. Eine zusätzliche dopplersonographische Untersuchung erlaubt die Erhebung des zerebralen Gefäßstatus und kann zur Früherkennung von Risikofaktoren sowie als Mittel in der Akutdiagnostik eingesetzt werden^{13, 37}.

Die Behandlung beinhaltet neben der allgemeinmedizinischen Versorgung auch eine Sekundärprophylaxe mit Thrombozytenaggregationshemmern wie Acetylsalicylsäure (ASS[®]) oder Clopidogrel (Iscover[®], Plavix[®]) sowie auch Coumarinen (z.B. Marcumar[®])³⁷. Ein weiterer Bestandteil der Therapie ist die Vorbeugung und Behandlung von Komplikationen. Die bedrohlichste Komplikation in der Akutphase des ischämischen Schlaganfalls ist die Ausbildung eines vasogenen Hirnödems^{12, 67}. Diese lebensgefährliche Komplikation wird durch eine Erhöhung des extrazellulären Wassergehaltes hervorgerufen¹².

Der spezifischen, rekanalisierenden Therapie bei der zerebralen Ischämie kommt jedoch eine besondere Bedeutung zu. Ziel ist die möglichst rasche Entfernung des das Gefäß verschließenden Blutgerinnsels durch medikamentöse oder mechanische Behandlung.

Zum jetzigen Zeitpunkt existiert als einzig zugelassenes Medikament zur pharmakologischen Thrombolyse das Präparat rt-PA (Alteplase[®]). Die intravenöse Therapie (0,9 mg/kg KG) führt innerhalb eines 4,5 Stunden-Zeitfensters zu einem signifikant verbesserten funktionellen Ergebnis der Patienten nach einem ischämischen Schlaganfall¹⁵¹. Über dieses Zeitfenster hinaus konnte eine allgemeine Wirksamkeit der systemischen Thrombolyse nicht gezeigt werden^{28, 65, 66}.

Die Haupteinschränkung für eine systemische Thrombolyse mit Alteplase[®] ist das begrenzte Zeitfenster. Wegen der zahlreichen Komplikationen, insbesondere die Einblutung in das Infarktareal, ist die Anwendung dieser Substanz nur unter strenger Indikationsstellung und Beachtung zahlreicher Kontraindikationen möglich. Daher wird dieses Therapieverfahren derzeit nur bei etwa 2-5% aller Schlaganfallpatienten angewandt^{37, 53, 70, 105, 131}. Alteplase[®] zeigt zudem eine begrenzte Wirksamkeit, begründet durch eine nur unvollständige Rekanalisationsrate sowie einer mitunter

vorkommenden zeitlichen Latenz bis zum tatsächlichen Eintreten der Rekanalisation. Die Rekanalisationsrate bei der systemischen Thrombolyse mit rt-PA liegt nach angiographischen Studien zwischen 34 und 47%. Dem gegenüber steht eine spontane Rekanalisationsrate bei unbehandelten Patienten im selben Zeitraum von 20%¹⁰³.

Die derzeit begrenzten Therapieoptionen bieten die Basis zur Entwicklung neuer Behandlungsverfahren. Rekanalisierende Therapieverfahren, welche unabhängig vom Gerinnungssystem arbeiten, stellen einen möglichen Ansatz dar. Hierzu könnte, neben der lokalen mechanischen Thrombenentfernung mit einem Katheter¹⁴³, auch der rt-PA-unabhängige Einsatz von therapeutischem Ultraschall zählen.

Die ultraschall-induzierte Thrombolyse (Sonothrombolyse), bezeichnet in der Schlaganfallforschung ein neues Therapieverfahren. Die Sonothrombolyse wurde in der Angiologie und der Kardiologie seit Jahren in mehreren Studien experimentell untersucht und wird in der Angiologie in Form eines Therapie-Kathetersystems auch klinisch angewendet^{8, 71}. Eine therapeutische Wirkung der Ultraschallthrombolyse konnte dabei in diversen Studien nachgewiesen werden^{2, 48, 49, 89, 135, 137}. Dieser ultraschall-induzierte Effekt entsteht zum einen durch die Induktion eines vermehrten Transportes von rt-PA in den Thrombus, die durch eine reversible Gefügelockerung der Fibrinstruktur bedingt ist¹³⁵. Zum anderen findet sich durch eine entsprechende Parameterwahl auch eine direkte lysierende Wirkung auf das Thrombusmaterial, so dass die Anwendung von Ultraschall auch ohne begleitende Gabe von rt-PA erfolgsversprechend erscheint¹²⁶.

Grundsätzlich kann zwischen einem invasiven und einem nicht-invasiven Einsatz des Ultraschalls unterschieden werden. Bei der invasiven Sonothrombolyse wird ein Schallkopf an der Spitze eines Katheters verwendet, welcher lokal das Blutgerinnsel beschallt¹¹. Nachteil dieser Behandlungsmethode ist neben der Invasivität, der große apparative Aufwand, so dass der Eingriff auch in Zukunft auf eine kleine Patientengruppe in höchstspezialisierten Zentren beschränkt bleiben wird.

Daher erscheint es unter dem Gesichtspunkt einer flächendeckenden Versorgung von Schlaganfallpatienten sinnvoll ein nicht invasives, transkraniales Ultraschallsystem zu entwickeln, dessen Sonde nur von außen auf die Haut über

dem Schädelknochen aufgesetzt werden muss und die Thrombolyse in dem betroffenen Gefäß ermöglicht.

Ausgehend von dieser Grundüberlegung wurden in dieser Arbeit im Tiermodell zwei verschiedene transkranielle Ultraschallverfahren in Anwendung bei der zerebralen Ischämie gegenübergestellt und deren Nebenwirkungsspektrum untersucht.

II. Übersicht

2.1. Einsatz von Nagern in der experimentellen Schlaganfallforschung

Es existieren zahlreiche tierexperimentelle Modelle zur Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie. Der Vorteil von Nagetieren gegenüber beispielsweise auch eingesetzten Fleischfressern oder Primaten liegt in der hohen inzuchtbedingten Homogenität der einzelnen Stämme¹⁶¹ und einer großen Ähnlichkeit zur menschlichen zerebrovaskulären Anatomie und Physiologie.

Ferner sind die Kosten für Anschaffung und Durchführung der Experimente bei kleinen Versuchstieren geringer. Ein weiterer Vorteil ist die größere gesellschaftliche Akzeptanz⁵⁸, was sich letztendlich auch gesetzlich niederschlägt (GG§20) und in Form des Tierschutzgesetzes (§§7-9a) die rechtlichen Rahmenbedingungen für einen Tierversuch vorgibt.

Obwohl Mäuse in den Vordergrund der Schlaganfallforschung rücken und verschiedenartige transgene Mäuse für knock-out- oder auch knock-in- Experimente durch vielfältige Fragestellungen betrachtet werden können, so ist ein wesentlicher Nachteil dieser Spezies, als auch des Gerbils, die fehlende *A. communicans posterior*¹⁴². Daher wird weiterhin die Ratte als Versuchstier in der Schlaganfallforschung eingesetzt. Die albinotischen Laborratten stammen von der Wanderratte (*Rattus norvegicus*) ab und werden seit ca. 100 Jahren in geschlossenen Kolonien gezüchtet¹⁶¹.

2.2. Vergleichende Anatomie des Gehirns von Ratte und Mensch

2.2.1. Allgemeine Anatomie

Das Gehirn liegt in der Schädelhöhle, welche durch das Tentorium cerebelli in einen rostralen Anteil für das Großhirn und in einen kaudalen Anteil für das Kleinhirn unterteilt wird⁸².

Das Gehirn lässt sich ontogenetisch und phylogenetisch in fünf Hauptabschnitte unterteilen:

Rhombencephalon mit My- und Metencephalon

Mesencephalon

Prosencephalon mit Di- und Telencephalon^{82, 159}

Bei der Ratte liegen die einzelnen Abschnitte weitgehend in ursprünglicher Art und Weise hintereinander angeordnet vor²². Beim Menschen umschließen die Großhirnhemisphären fast vollständig den Truncus cerebri¹²⁴, welcher eine fast rechtwinklige Biegung in die Vertikale aufweist¹⁵⁴.

Bei der Ratte und dem Menschen besteht das Gehirn aus zwei Hemisphären, welche durch die längsverlaufende Fissura longitudinalis cerebri getrennt sind und im mittleren Bereich durch das Corpus callosum verbunden werden^{115, 154}. Die Ratte verfügt über ein lissencephales Gehirn mit glatter Kortexoberfläche¹³⁴. Im Gegensatz dazu besitzt der Mensch ein gyrencephales Gehirn, dessen Kortex zur Vergrößerung der Oberfläche zu Gyri und Sulci gefaltet ist¹⁵⁴.

2.2.2. Extrakranielle Gefäßversorgung

Die A. carotis communis gabelt sich beim Menschen und bei der Ratte in die A. carotis externa und A. carotis interna auf. Die A. carotis interna tritt beim Menschen ohne weitere Äste abzugeben in den Canalis caroticus der Schädelbasis über. Bei

der Ratte zweigt die A. pterygopalatina ab, welche der aus der A. carotis externa abgehenden A. maxillaris des Menschen entspricht^{134, 155}.

Bei der Ratte und beim Menschen teilt sich die A. carotis externa unterschiedlich auf. Die A. carotis externa der Ratte gibt zuerst die A. occipitalis und dann die Aa. thyroidea superior ab. Im Anschluss teilt sie sich in ihre Endäste A. maxillaris externa und A. lingualis auf¹³⁴. Beim Menschen gibt die A. carotis externa zuerst die Aa. thyroidea superior, lingualis und facialis ab. Danach entspringen nach medial die A. pharyngea ascendens und nach dorsal die Aa. occipitalis und auricularis posterior¹⁵⁵. Anschließend teilt sie sich auch in zwei Endäste, die A. maxillaris und A. temporalis superficialis auf (Abb. 1).

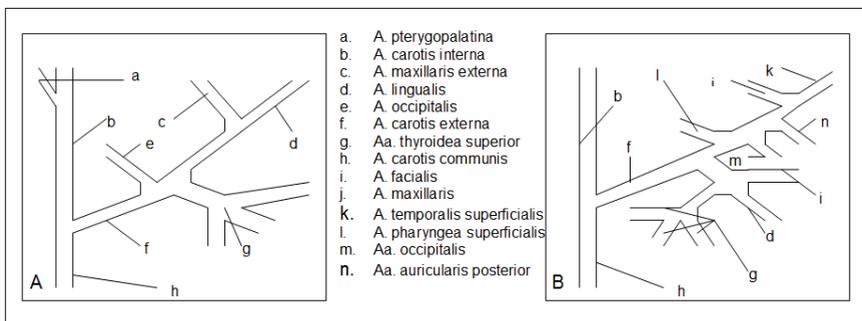


Abb. 1: Schematische Darstellung der extrazerebralen Gefäßversorgung der Ratte (A) und des Menschen (B) (nach Walberer, 2005)

2.2.3. Intrakranielle Gefäßversorgung

Beim Menschen und bei der Ratte stellt die A. carotis interna das Hauptgefäß der intrakraniellen Gefäßversorgung dar, welche als erstes die A. communicans posterior abgibt und sich im weiteren rostralen Verlauf in die A. cerebri media und die A. cerebri anterior aufteilt. Beim Menschen entspringen aus der A. cerebri media zentral die Aa. lenticulostriatæ als Enderarterien^{72, 123}.

Die A. basilaris entsteht bei beiden Spezies durch die Fusion der beiden Vertebralarterien. Sie verläuft über den ventralen Anteil des Hirnstammes und gibt die Aa. cerebri posteriores ab, welche auf beiden Seiten über die Aa. communicantes

posterior mit den Aa. carotides internae verbunden sind. Bei der Ratte fusionieren die Aa. cerebri anteriores der beiden Hemisphären zu einem einzigen Gefäß, während sie beim Menschen getrennt nach rostral ziehen und durch die A. communicans anterior verbunden werden. Die funktionelle Bedeutung ist auch bei anatomischer Abweichung identisch (Abb. 2). Varianten des Circulus arteriosus cerebri treten sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte häufig auf^{123, 134, 154, 155}.

Aus dem Circulus arteriosus und aus der A. basilaris entspringen Zirkumferenzarterien, welche auf der Hirnoberfläche verlaufen und zahlreiche meningeale Anastomosen eingehen. Desweiteren gehen aus den proximalen intrakraniellen Gefäßen, aus dem Circulus arteriosus und den basalen Abschnitten der Zirkumferenzarterien paramediane Äste hervor. Diese intrazerebralen Arterien sind funktionelle Endarterien¹²³.

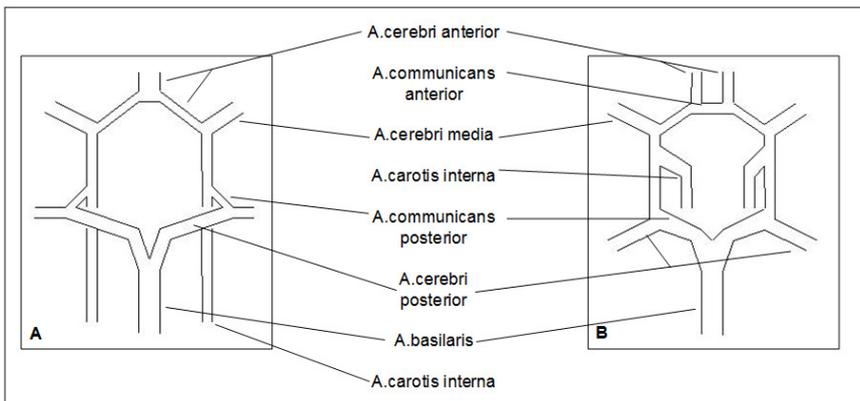


Abb. 2: stark vereinfachte schematische Darstellung der intrazerebralen Gefäßanatomie (Circulus arteriosus cerebri) der Ratte (A) und des Menschen (B)

2.3. Pathogenese des Schlaganfalls

Der Schlaganfall beim Menschen lässt sich nach vaskulärer (95%) und nicht vaskulärer (5%) Ätiologie aufteilen. Die zerebrale Ischämie gehört zu den vaskulären Ursachen und macht hier 85% der Vorkommnisse aus. Davon lassen sich 30% auf kardiogene (intrakavitäre Thromben, paradoxe Embolien) und 50% auf

zerebrovaskuläre Ätiologien (Gefäßstenosen, -verschlüsse, arterioarterielle Embolien) zurückführen^{18, 123, 160}.

Im Gegensatz zu einer globalen Ischämie, bei der die gesamte Blutversorgung des Gehirns unterbrochen ist (z.B. beim Herzstillstand)^{79, 123}, ist die häufigste Ursache eines Infarktes der embolische Verschluss einer zerebralen Arterie¹²³. Bei einer Embolie kommt es zu einer plötzlichen Blockade eines Gefäßes und damit zur Durchblutungsstörung in dem zu versorgenden Gebiet^{147, 160}. Thromben und Embolien können als Komplikationen, bedingt durch arteriosklerotische Einengungen des Gefäßlumens, entstehen^{97, 140}.

Durch einen embolischen oder lokal thrombotischen Verschluss von großen Hirnoberflächenarterien entstehen Territorialinfarkte. Bei einer partiellen Kollateralisierung des Randbezirks entstehen zentrale Infarkte. Basalganglieninfarkte, die eine Sonderform des Territorialinfarktes sind, entstehen durch die Okklusion der Aa. lenticulostriatae am Abgang des Gefäßbündels aus der A. cerebri media¹²³.

2.3.1. Stenosen

Stenosen der hirnversorgenden Gefäße können hämodynamisch bedingte Infarkte auslösen, häufiger sind sie aber die Ursache von Embolien¹²³. Sie entstehen durch ein Zusammenspiel von verschiedenen Risikofaktoren¹²³, wie Hypertonus oder Diabetes.

Durch endotheliale Läsionen kommt es zum Einstrom von Lipiden in die Intima. Diese werden von Makrophagen phagozytiert und in zytoplasmatischen Vakuolen gespeichert. Die so entstandenen Schaumzellen sezernieren Wachstumsfaktoren und fördern so die Proliferation von Bindegewebe und Myozyten (fibröse Plaques). Im weiteren Verlauf entstehen durch Kalksalzeinlagerungen atheromatöse Plaques. Eine Ruptur dieser Plaques führt zur Freilegung der subintimalen Strukturen und fördert die Thrombusbildung^{97, 140}.

2.3.2. Thrombusbildung und Emboliegenese

Durch eine Verletzung des Endothels kommt es zur Kollagenfreilegung (Abb. 3A). Dies führt zu einer durch den von-Willebrandt-Faktor vermittelten Anlagerungsreaktion der Thrombozyten. Die Adhäsion löst die Aktivierung der Thrombozyten aus, welche Signalstoffe sezernieren und die Adhäsion weiterer Thrombozyten fördern. Durch die Exposition von bestimmten Glykoproteinen kommt es zur Bildung eines Thrombozytenaggregats^{79, 139, 140}. Nach Ablauf der primären Hämostase setzt die sekundäre Hämostase ein, um aus dem Thrombozytenthrampus durch die Bildung von mechanisch stabilem Fibrin ein stabiles Gebilde zu machen^{79, 139, 140, 147}. Bei dieser enzymatischen Kaskade katalysiert die aktivierte Form eines Gerinnungsfaktors die Aktivierung des nächsten¹⁴⁷. Die erste Phase ist die *Aktivierungsphase*. Sie bezeichnet die Entstehung von Thrombin aus Prothrombin. Darauf folgt die *Koagulationsphase*, in der durch Abspaltung von Fibrinpeptiden aus Fibrinogen lösliche Fibrinmonomere gebildet werden, die zu unlöslichem Fibrin verkleben. In der letzten Phase, der *Retraktionsphase*, verfestigt sich durch Wasserverlust und Fibrinretraktion das Blutgerinnsel^{79, 139, 147} (Abb. 3B). Um eine überschüssige Gerinnung mit daraus resultierender Thrombose und Embolie zu vermeiden, existieren rückgekoppelte Hemmfaktoren^{79, 139}.

2.3.3. Dynamik der Thromben

Bereits gebildete Thromben können größer werden, eine regressive Veränderung erfahren oder sich vom Ort der Entstehung lösen (Thrombembolie)¹⁴⁷.

Im Regelfall werden größere Thromben organisiert. Im Thrombusbereich vermehren sich die Endothelzellen und überziehen den nicht mit der Wand verbundenen Anteil. Im Thrombus entfalten Endothelzellen mit eingewanderten Monozyten ihre fibrinolytische Aktivität. Nach einiger Zeit wandern Fibroblasten ein und bilden kollagene Fasern. Aus Endothelsprossen entstehen Kapillaren. Der Thrombus ist dann von Granulationsgewebe durchsetzt¹⁴⁷.

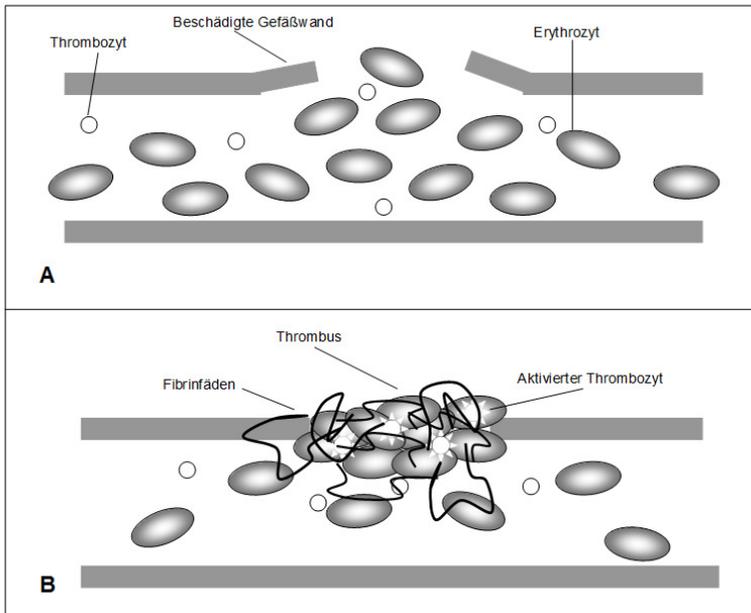


Abb. 3: stark vereinfachte schematische Darstellung der Thrombusbildung mit Beginn der primären Hämostase (A) und Abschluss der sekundären Hämostase mit Gerinnungsbildung (B).

Eine Auflösung von Thromben kann durch Fibrinolyse, puriforme Erweichung oder purulente Erweichung bei bakterieller Besiedlung erfolgen. Bei der Fibrinolyse entsteht die Serinprotease Plasmin aus der inaktiven Vorstufe Plasminogen durch die Wirkung von Blut-(t-PA) oder Gewebeaktivatoren. Der freigesetzte Gewebeaktivator wird an Fibrin fixiert und kann mit dem fibrin gebundenen Plasminogen reagieren⁵¹. Mit der Bildung eines Komplexes aus Fibrin, t-PA und Plasminogen wird ein Ordnungszustand hergestellt, welcher dem Aktivator eine rasche Umwandlung des Plasminogens zu Plasmin ermöglicht. Das aktivierte Plasmin bleibt am Fibrin fixiert und spaltet dieses über Zwischenstufen in lösliche Bruchstücke auf^{51, 79, 139}. Plasmin wird durch Bindung an $\alpha 2$ -Antiplasmin und t-PA in der Leber inaktiviert. Bei der puriformen Erweichung wird durch proteolytische Enzyme der eingeschlossenen Leukozyten der verflüssigte Inhalt der Thromben entleert und ein Hohlkörper entsteht¹⁴⁷.

Die Rekanalisation des Gefäßes ist ebenfalls möglich. Entweder erweitern sich die in das Gewebe eingesprossenen Kapillaren unter dem Einfluss des Blutdrucks oder die

Retraktion bewirkt Lückenbildungen, welche von Endothel ausgekleidet werden und ein neues Gefäßlumen bilden¹⁴⁷.

2.3.4. Interventionsmöglichkeiten

Klinisch ist die systemische Applikation von rt-PA („recombinant tissue plasminogen activator“) ein etabliertes Verfahren in spezialisierten Zentren und hat sich bei Anwendung in den ersten 3 Stunden nach Ischämiebeginn als wirksam erwiesen. Seit August 2000 ist das Präparat Actilyse® (Firma Boehringer-Ingelheim, Ingelheim) für diesen Zeitraum in Deutschland zugelassen. Allerdings gibt es Hinweise, dass bei selektierten Patienten eine effektive Durchführung der Thrombolyse in einem erweiterten Zeitfenster möglich und sinnvoll ist. So konnte in einer duplexsonographischen Studie gezeigt werden, dass eine verzögerte Rekanalisation (6 bzw. 24 Stunden nach ischämischen Insult) infolge intravenöser Thrombolyse mit rt-PA mit einem verbesserten klinischen Ergebnis der Patienten assoziiert ist¹⁶⁴. Ausserdem konnte für die intraarterielle Thrombolyse eine Effektivität in einem Zeitfenster von bis zu 6 Stunden nach akutem zerebralen Gefäßverschluss gezeigt werden⁵². Diese Therapie ist aber wegen der erforderlichen apparativen Ausstattung spezialisierten Zentren vorbehalten.

Weitere Studienergebnisse⁶⁴ belegen die Wirksamkeit in einem Zeitraum bis 4,5 h, eine entsprechende Erweiterung der Zulassung ist in nächster Zeit zu erwarten.

Die Anwendung dieser Substanz zur Thrombolyse ist nur unter strenger Indikationsstellung und Beachtung zahlreicher Kontraindikationen möglich. Gründe dafür sind die möglichen Komplikationen (insbesondere Einblutungen in das Infarktareal). Dieses Therapieverfahren wird derzeit nur bei etwa 2 bis 5% aller Schlaganfallpatienten angewendet^{37, 53, 70, 105, 131}.

Für therapeutische Zwecke wird überwiegend gentechnologisch hergestellter einkettiger rekombinanter humaner Gewebe-Plasminogenaktivator verwendet⁵¹. Alteplase® aktiviert hauptsächlich fibingebundenes Plasminogen, wodurch Plasmin am Thrombus gebildet und fixiert wird. Dadurch kann es nicht von im Blut vorhandenem α 2-Antiplasmin inaktiviert werden⁵¹.

Allergische Reaktionen bleiben aus, weil keine Antikörperbildung erfolgt⁵¹.

2.4. Pathophysiologie des Schlaganfalls

2.4.1. Infarktkern und Penumbra

Das Gehirn ist auf eine permanente Substratzufuhr angewiesen, da das Gehirnparenchym fast keine Sauerstoff- oder Glukosevorräte besitzt^{79, 123}. Der zerebrale Blutfluss (CBF) eines gesunden Erwachsenen beträgt ca. 60-80 ml pro 100g Hirngewebe. Die Ischämieschwelle liegt bei ca. 20 ml pro 100g Hirngewebe. Wird dieser Wert unterschritten, kommt es zu reversiblen neurologischen Störungen¹²³. Wird hingegen die Infarktschwelle von ca. 10 ml pro 100g Hirngewebe für mehrere Minuten unterschritten, resultiert aus dem Funktions- und Strukturverlust, ein Infarkt^{18, 123}.

Das Gehirn kann nur kurzfristig die anaerobe Glucoseverwertung nutzen, da sie eine sehr geringe Energieausbeute gewährleistet und eine Laktatakkumulation auftritt^{18, 79, 123}. Die pH-Verschiebung in den sauren Bereich fördert die Wirkung der aus den sich auflösenden Lysosomen freigesetzten Proteasen im Zytoplasma (Kolliquationsnekrose). Die Eiweißdenaturierung und Dehydratation führen zur Koagulationsnekrose¹⁴⁷.

Bei den Nervenzellen im nicht perfundierten Infarktkern tritt nach 3-5 Minuten der Zelltod ein¹⁴⁰. Der CBF-Bereich zwischen Infarkt und Ischämieschwelle wird als Penumbra bezeichnet^{10, 123}. Dieses Hirnareal ist funktionsgestört und gefährdet ("tissue at risk"). Aufgrund des bestehenden Strukturstoffwechsels kann dieses Gewebe bei frühzeitig eingeleiteter Therapie gerettet werden^{10, 18, 123}.

Die in diesem Hirnareal aktiv ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge führen im Verlaufe von Stunden zu einem sukzessiven Absterben der Nervenzellen – es kommt zu einer weiteren Ausbreitung der Infarktzone. Das minderperfundierte Hirnvolumen geht in den folgenden 3 bis 6 Stunden zu Grunde und ist daher nur in diesem engen Zeitfenster für therapeutische Interventionen erreichbar^{21, 70, 93}.

2.4.2. Die postischämische Kaskade

Während der fokalen zerebralen Ischämie führen mehrere Mechanismen, die sowohl zeitlich gestaffelt als oder auch überlappend ablaufen, zum Zelluntergang: Exzitotoxizität, Freisetzung freier Radikale, Inflammation und apoptotischer Zelltod. In ihrer Gesamtheit werden diese Prozesse als „postischämische Kaskade“ bezeichnet⁹³.

2.4.2.1. Exzitotoxizität

In der frühen Phase der fokalen zerebralen Ischämie überwiegt die Exzitotoxizität. Durch den Energiemangel wird die Na/K-ATP-ase gehemmt und es kommt zur zellulären Akkumulation von Natrium und einer Zunahme der extrazellulären Kalium-Konzentration. Durch Beeinträchtigung des Natrium-Calcium-Austauschers kommt es zusätzlich zu einem zytosolischen Calcium-Anstieg¹⁴⁰, in dessen Folge eine Depolarisation der Zellmembran und die Aktivierung der spannungsabhängigen Calcium- und Natriumkanäle auftritt. Es kommt zur präsynaptischen Freisetzung von exzitatorischen Transmittern (z.B. Glutamat)^{18, 21, 123}. Durch die unphysiologisch hohe intrazelluläre Calcium-Konzentration kommt es zur Produktion von freien Radikalen, Arachidonsäuremetaboliten, konstitutive Stickstoffmonoxid-Bildung und Aktivierung der Stickstoffmonoxidsynthase, welche zu einer zusätzlichen Zellschädigung führen^{79, 123, 139}.

2.4.2.2. Freie Radikale

Unter physiologischen Bedingungen unterliegt die Bildung und Elimination freier Radikale einem Gleichgewicht. Bei einer zerebralen Ischämie, insbesondere wenn es durch eine Rekanalisierung des verschlossenen Gefäßes zu einer Reperfusion kommt, steigt die Konzentration freier Radikale im Gewebe an^{104, 122}.

Diese freien Radikale entstehen im Verlauf der postischämischen Kaskade durch die Aktivierung von Proteasen, Phospholipasen und Endonukleasen. Die Zellen besitzen zur Abwehr dieser toxischen Radikale verschiedene enzymatische sowie nicht-enzymatische Mechanismen⁹⁴. Durch eine Überlastung der endogenen und das

Versagen energieabhängiger Abwehrmechanismen steigt die Konzentration freier Radikale im betroffenen Gewebe weiter an¹²⁸. Diese führen dann zu einer direkten Schädigung von Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, DNA und zur Lipidperoxidation, in dessen Folge letztlich die Zellmembran geschädigt und die Apoptose bzw. Nekrose eingeleitet wird^{93, 138}.

2.4.2.3. Inflammation

Im weiteren Verlauf reagiert das Gehirn auf die Ischämie und einsetzende Nekrose¹⁴⁰ mit einer Entzündungsreaktion⁹. Durch den Energiemangel sind die Zellen vermehrt oxidativen Schädigungen ausgesetzt. Durch eine Zerstörung der Zellmembran und der damit verbundenen Freisetzung intrazellulärer Makromoleküle kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems und zur Entzündung, welche zu weiteren Zellschädigungen führt¹⁴⁰. Zunächst kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Leukozytenzahl in den Kapillaren⁶⁹. Diese Akkumulation scheint im Falle einer Reperfusion die mögliche Ursache für einen herabgesetzten lokalen Blutfluss zu sein, der auch als „no-reflow-Phänomen“ bezeichnet wird⁶¹. Mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen können die Leukozyten durch die Kapillaren in das Hirngewebe einwandern⁵⁹. Im ZNS residente Mikroglia und Astrozyten werden durch ischämiebedingte Zytokine aktiviert⁹. Diese Zytokine können über eine weitere Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten, über die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und über die Verstärkung der Produktion freier Radikale zum ischämischen Zellschaden beitragen^{85, 123, 125}.

Stickstoffmonoxid ist ein weiteres potentiell zytotoxisches Molekül. Es wird von aktivierten Entzündungszellen gebildet und anschließend freigesetzt. Die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase ist eine Isoform der Stickstoffmonoxidsynthase, welche nur unter pathologischen Bedingungen, vor allem von Makrophagen und Mikroglia, aber auch von Neuronen und Astrozyten exprimiert wird¹⁰⁹.

Die Stickstoffmonoxidsynthase führt zu der Produktion toxischer Mengen von Stickstoffmonoxid und führt zu einer weiteren Schädigung der ohnehin gefährdeten Zellen¹²³. Stickstoffmonoxid wirkt über die Aktivierung der Guanylatcyclase als

Vasodilatator und verstärkt als Transmitter den exzitatorischen Einfluss von Glutamat^{70, 79}.

2.4.2.4. Apoptose

In der Spätphase der postischämischen Kaskade stehen die apoptotischen Vorgänge im Vordergrund. Als Apoptose wird der „programmierte Zelltod“ bezeichnet. Dieser Vorgang wird bei Neuronen aktiviert, wenn diese keinen synaptischen Kontakt zu anderen Zellen aufbauen können. Dies ermöglicht ein kontrolliertes Absterben der überflüssigen Zellen ohne die Nachbarzellen zu schädigen. Dabei leiten die Zellen durch eine Aktivierung endogener Proteasen (Caspase) ihre Apoptose ein. Dies führt zu einer Auflösung des Zellkerns und einer Spaltung der DNA in charakteristische Bestandteile¹²⁰. Bei der zerebralen Ischämie konnte an Hand von Tiermodellen gezeigt werden, dass ein großer Teil der Neurone durch Apoptose untergeht⁹².

2.4.3. Ödembildung

Durch das Versagen der Na/K-ATP-ase und die einsetzende Depolarisierung kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Chlorid-Konzentration¹⁴⁰. Wasser folgt dem osmotischen Gradienten und dies führt zu einer Zellschwellung¹⁴⁰. Durch die Schwellung der Astrozyten wird der Extrazellulärraum verringert, es entsteht ein *zytotoxisches Ödem*^{123, 140}.

Ein Infarkt kann auch Ursache einer gesteigert Gefäßpermeabilität sein¹⁴⁰. Durch diese gesteigerte Permeabilität der Hirnkapillaren werden Proteine in den interstitiellen Raum gefiltert, wobei das Wasser ebenfalls dem osmotischen Gradienten folgt und es zu einer Zunahme des interstitiellen Raums kommt. Es entsteht ein *vasogenes Ödem*^{123, 140}.

Das Hirnödem betrifft zuerst die ipsilaterale Hemisphäre. Der Liquorraum wird kompensatorisch gepresst und mit Hirngewebe ausgefüllt^{123, 140}. Das vasogene Ödem führt zu einem erhöhten intrakraniellen Druck und kann im weiteren Verlauf zu einer Herniation führen^{124, 158}. Dieser Mechanismus ist für die überwiegende Zahl der Todesfälle in der Frühphase des Schlaganfalls verantwortlich^{19, 55}. Ferner können die Erhöhung des intrakraniellen Drucks und die resultierende lokale Kompression von

Kollateralgefäßen in den Randzonen des Infarktgebietes zu einer Minderung des regionalen zerebralen Blutflusses führen und so sekundäre Hirnschäden verursachen und das Infarktvolumen vergrößern⁴².

2.5. Technik zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien an der Ratte

Zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien an der Ratte existieren zahlreiche Tiermodelle. Grundsätzlich ist eine Aufteilung in endovaskuläre und nicht-endovaskuläre Verfahren möglich. Bei einer Vielzahl von nicht-endovaskulären Modellen wird eine Kraniotomie durchgeführt. Diese Techniken haben im Vergleich zu den endovaskulären Modellen einen invasiveren Charakter und führen wegen der Eröffnung der Schädelkalotte, zu einer Beeinflussung des intrakraniellen Drucks, der Blut-Hirn-Schranke und der lokalen Gehirntemperatur²⁹. Ein weiterer Nachteil der Kraniotomie ist die Möglichkeit die Kortexoberfläche zu verletzen und das Auftreten von subarachnoidalen Blutungen⁶³.

Das Fadenmodell zählt zu den endovaskulären Modellen und wurde erstmals 1986 von Koizumi et al.⁸⁰ beschrieben. Es ist das am häufigsten eingesetzte Modell zur Untersuchung der Pathophysiologie fokaler zerebraler Ischämien sowie zur Evaluation neuer Therapieverfahren und kann zur Induktion von permanenten sowie transienten Gefäßverschlüssen mit definiertem Reperfusionzeitpunkt eingesetzt werden. Dieses Modell ist von einer Vielzahl von Arbeitsgruppen modifiziert worden^{16, 84, 95, 98, 107, 119, 157}.

Bei diesem Verfahren wird durch eine Arteriotomie der A. carotis communis ein Nylonfilament kranial bis zum Abgang der A. cerebri media eingeführt. Dies führt zu gut reproduzierbaren Infarkten im Versorgungsgebiet dieses Gefäßes^{80, 150}. Das Modell zeichnet sich durch eine leichte Anwendbarkeit, geringe Invasivität und eine gute Reproduzierbarkeit aus.

Ein Nachteil dieses Modells ist die Verlegung der A. hypothalamica, welche aus der distalen A. carotis interna entspringt. Damit verbunden ist eine Infarzierung des Hypothalamus welche innerhalb weniger Minuten zu einer massiven Störung der Temperaturregulation führt. Dies zeigt sich in einem Anstieg der Körpertemperatur bis über 40°C. Diese pathologische Hyperthermie, wird beim Menschen nicht

beobacht. Sie führt zu einer Aggravation der ischämischen Läsionen und kann nachweislich die Wirksamkeit neuroprotektiver Substanzen beeinträchtigen^{91, 99, 167}. Diese Nebenwirkung kann umgangen werden, wenn das Fadenokklusionsmodell zur Induktion transientser Ischämien eingesetzt wird. Dafür wird der Faden zu einem definierten Zeitpunkt zurückgezogen um eine Reperfusion zu ermöglichen. Wenn der Zeitpunkt unter 90 Minuten gewählt wird, kommt es zu einer vollständigen Erholung des Hypothalamus und eine Hyperthermie tritt nicht auf.

2.6. Neurologischer Status

Die Symptomatik, die bei einem Schlaganfall auftritt, wird durch die Lokalisation der Durchblutungsstörung und damit durch das in Mitleidenschaft gezogene Versorgungsgebiet des Gefäßes bestimmt¹⁴⁰. Das Mediasyndrom ist die häufigste klinische Manifestation des Schlaganfalls¹²³. Im Mediaterritorium finden sich kortikale Territorialinfarkte mit sensiblen, motorischen oder sensomotorischen, kontralateralen Halbseitensyndromen oder Störungen der Blickmotorik¹²³. Ursachen sind der Ausfall der lateralen Gyri prae- und postcentrales¹⁴⁰. Bei subkortikalen Infarkten steht eine Hemiparese infolge von geschädigten Pyramidenbahnen¹⁴⁰ im Vordergrund, ggf. auch Sensibilitätsstörungen. Ist die Sehbahn betroffen, tritt eine Hemianopsie auf¹²³.

Es existiert eine Vielzahl von Tests, um motorische, sensorische sowie kognitive Defizite zu beurteilen. Im Zusammenhang mit Schlaganfallmodellen wurden die Tests von Zea Longa et al.⁹⁵, Zausinger et al.¹⁶⁶ und Nedelmann et al.¹¹⁴ beschrieben. Der Test von Nedelmann et al. zeigt eine signifikante Korrelation von Infarktvolumen und Neuroscore. Er erlaubt verlässliche Aussagen über die motorischen, sensorischen und koordinativen Beeinträchtigungen im Zusammenhang mit Schlaganfällen¹¹⁴.

Um motorische Defizite bei kleinen Gruppengrößen festzustellen, findet der Rotarod-Test Anwendung. Seine Aussagen sind sensitiver als der beam-balance oder beam-walking-Test⁷¹.

2.7. Die Kernspintomographie

2.7.1. Physikalische Grundlagen

Als Kernspin versteht man den Eigendrehimpuls von Atomkernen mit ungerader Protonen-/Neutronenzahl⁸⁷. Werden diese Atomkerne in ein äußeres magnetisches Feld eingebracht, so richten sich diese parallel oder antiparallel aus^{44, 87}. Es setzt eine Kreiselbewegung (Präzession) entlang der Magnetfeldlinien ein. Diese auf einem Kegelmantel einsetzende Präzession ist abhängig von der Feldstärke und wird Larmorfrequenz genannt^{44, 87}. Die Ausrichtung der Atomkerne ist durch eingestrahlte elektromagnetische Hochfrequenz-Wellen (HF-Impulse), welche über eine Sendeantenne emittiert werden, beeinflussbar. Diese Interaktion entspricht der Kernspinresonanz⁸⁷. Dabei wird die Energie von den Kernen aufgenommen. Ihre Richtungsänderung (Quermagnetisierung) ist impulsabhängig. Das Zurückklappen (Relaxation) in die Ausgangslage^{44, 87} erzeugt ein elektromagnetisches Induktionsfeld, welches von einer Empfängerantenne aufgenommen wird. Das Signal muss verstärkt werden, weil ein Grossteil als Wärme verloren geht und der Bildgenerierung nicht zur Verfügung steht (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)⁸⁷. Die Relaxation wird durch die Bindung im Molekül charakterisiert. Die chemische Zusammensetzung des Gewebes bestimmt, neben der Feldstärke und Pulssequenz, den Bildkontrast⁸⁷. Mittels Fouriertransformationen wird aus den empfangenen Signalen die Bildinformation berechnet.

Zusätzlich angebrachte Spulen gleichen Umfeldgegebenheiten, welche die Homogenität des Magnetfeldes stören, aus (Shimsystem)⁸⁷.

Eine Ortslokalisierung wird durch zusätzliche Spulen in den 3 Raumrichtungen möglich (Gradientensystem). Sie induzieren einen kleinen ortsabhängigen Unterschied im Magnetfeld, welcher vom Prozeßrechner einzeln schaltbar ist⁸⁷.

2.7.2. Technische Grundlagen der Bildgebung

T1-Relaxationszeit (Spin-Gitter-Relaxationszeit)

Diese Zeitkonstante bezeichnet die Rückkehr der H⁺-Atome in die Gleichgewichtsverteilung vor dem HF-Impuls⁴⁴.

Bei einer T1-gewichteten Bildgebung sind Gewebe mit einer kürzeren T1-Relaxationszeit signalintensiver dargestellt⁸⁷.

T2-Relaxationszeit (Spin-Spin-Relaxationszeit)

Diese Zeitkonstante bezeichnet den Abfall der Quermagnetisierung.

Bei einer T2-gewichteten Bildgebung sind Gewebe umso signalintensiver, je länger die T2-Relaxationszeit ist^{44, 87}.

Spin-Echo-Sequenz

Durch diese von Carr und Purcell entwickelte Pulsfolge wird die von der Inhomogenität des äußeren Magnetfeldes ausgelöste Abnahme der Quermagnetisierung ausgemittelt¹⁶⁵. Nach der Quermagnetisierung wird anhand von in definierten Zeitintervallen geschalteten 180° - Impulsen eine Refokussierung des Spins erzeugt. Dies führt zu einer Signalintensitätssteigerung, welche nur auf die transversale Relaxationszeit T2 zurückzuführen ist¹⁶⁵.

RARE-Sequenz (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement)

Dies ist eine modifizierte Spin-Echo-Sequenz. Durch multiple 180°-Pulse, welche anders phasenkodiert sind, führen diese zu einer beschleunigten T2-gewichteten Bildgebung⁸⁷.

Gradienten-Echo-Sequenz

Durch Einstrahlung des ersten Impulses in einem niedrigeren Flip-Winkel als 90° und durch Schaltung eines Gradienten, wird eine T1-gewichtete Schnellbildgebung erzielt⁸⁷.

Bei einer $T2^*$ -Gewichtung ist der erreichte Kontrast nicht der reine Gewebsparameter T2, sondern wird von einem zweiten Dephasierungsvorgang überlagert. Dieser ist abhängig von der Qualität (Inhomogenität) des Feldes. Durch Inhomogenitäten dephasieren die Protonen schneller und eine schnellere Bildgebung ist möglich⁴⁴.

2.7.3. Darstellung von infarziertem Gewebe

Die *T1-gewichtete Spin-Echo-Sequenz* gibt die anatomischen Verhältnisse in guter Auflösung wieder. Anhand dreier Merkmale lassen sich frühe Hirninfarkte erkennen:

Zeichen einer lokalen Hirnschwellung infolge des zytotoxischen Ödems

parenchymale Hypointensität infolge der Verlängerung der T1-Zeit bei einem zytotoxischen Ödem

vaskuläres Enhancement nach Kontrastmittelgabe durch Verringerung der Hirnperfusion mit Verlangsamung des arteriellen Flusses bei gleichzeitig kompensatorisch weitgestellten Gefäßen

Vaskuläres (arterielles) Enhancement kann schon wenige Minuten nach Ischämiebeginn auftreten. Sie ist jedoch kein absolut verlässliches Anzeichen für einen irreversiblen Gewebsuntergang, da es auch bei lokaler Minderperfusion auftritt. Ferner tritt dieses Phänomen nicht immer bei einer akuten zerebralen Ischämie auf⁷³.

Im *T2-gewichteten MRT-Bild* erscheinen Hirninfarkte hyperintens. Der Einstrom von Wasser in den Extrazellularraum, welcher in Folge des Zusammenbruchs der Blut-Hirn-Schranke auftritt, bewirkt einen signifikanten Anstieg der T2-Relaxationszeit (Phase des vasogenen Ödems) bereits 20-25 Minuten nach Gefäßverschluss⁵⁷. Infarziertes Hirngewebe enthält auch während der Nekrose- und

Resorptionsvorgänge mehr Wasser als physiologisches Gewebe, daher bleibt die Hyperintensität in T2-gewichteten Aufnahmen bis ins chronische Stadium des Infarktes bestehen⁷³.

Die *diffusionsgewichtete MRT-Bildgebung* erlaubt die Messung kleinster, stochastischer Bewegungen der Wassermoleküle in vitro, wie in vivo. Zu diesen tragen in vivo die:

Brownsche Molekularbewegung

die kapilläre Perfusion und

mikroskopische Wasserverschiebungen zwischen unterschiedlichen Kompartimenten bei⁷³.

Die Diffusion des Wassers lässt sich durch den Diffusionskoeffizienten ADC (apparenter Diffusionskoeffizient) quantifizieren. In akuten ischämischen Hirnläsionen kann eine Wasserverschiebung aus dem extra- in das intrazelluläre Kompartiment (zytotoxisches Ödem) beobachtet werden, die durch das ischämie-bedingte Versagen der Adenosin-Triphosphat (ATP)-Pumpe begründet ist. Dies kann durch die diffusionsgewichtete MRT-Bildgebung als eingeschränkte Diffusion der Wassermoleküle bzw. Erniedrigung des Diffusionskoeffizienten quantifiziert werden^{17, 25}.

2.7.4. Die MRT-Morphologie des Rattengehirns anhand einer T2-gewichtete Bildgebung

Die MRT-Bildgebung ermöglicht eine Schnittführung durch das Gehirn in alle drei Raumrichtungen. Die gewählte Schichtdicke beeinflusst die Untersuchungszeit sowie die Auflösung. Im Folgenden (Abb. 4) ist eine koronare Schnittführung mit einer Schichtdicke von 2mm von rostral nach kaudal durch das Gehirn einer Sprague-Dawley Ratte⁷ ohne pathologischen Veränderungen dargestellt:

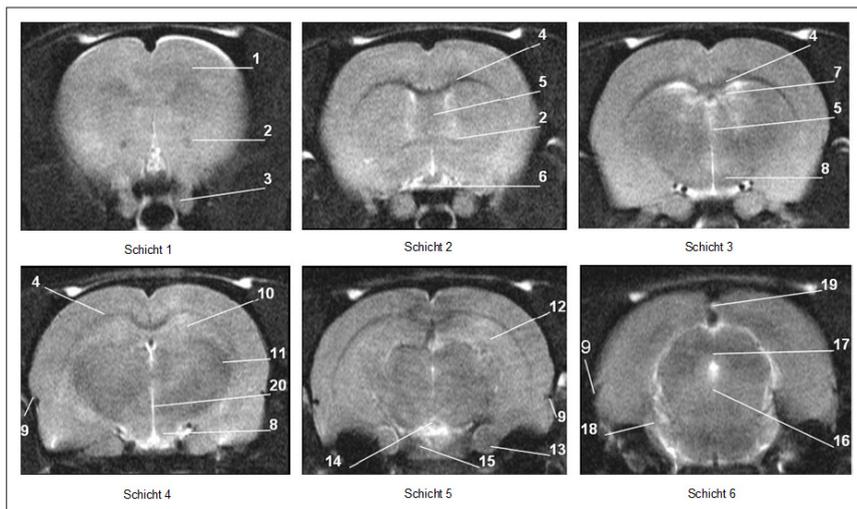


Abb. 4: Morphologie des Gehirns (T2-gewichtete Bildgebung; Schichtdicke 2mm) 1=rechte Hemisphäre; 2=Commissura anterior; 3=Nervus opticus; 4=Corpus callosum; 5=Septum; 6=Chiasma opticum; 7=Seitenventrikel; 8=Hypothalamus; 9=Fissura rhinalis; 10=Hippocampus dorsalis; 11=Thalamus; 12=Hippocampus; 13=N.trigeminus; 14=Nucleus interpeduncularis; 15=Hypophyse; 16=Raphe; 17=Aquaeductus cerebri; 18=Pedunculus cerebellaris medius; 19=Corpus pinealis; 20=Dritter Ventrikel

2.8. Die Ultraschalltechnologie

2.8.1. Physikalische Grundlagen

Ultraschallwellen sind mechanische Schwingungen. Sie entstehen durch die Umwandlung elektrischer Schwingungen in mechanische Schwingungen⁷⁸. Dazu wird ein Hochfrequenz-Wechselfeld an ein Piezokristall angelegt⁷⁸. Dadurch kommt es zu Dickenschwankungen und zur Aussendung von Ultraschallwellen (negativer piezoelektronischer Effekt)^{78, 87}. Empfangene Echos erzeugen durch eine mechanische Verformung des Kristalls eine Ladungsverschiebung und so eine abtastbare Spannung⁸⁷ (positiver piezoelektronischer Effekt)⁷⁸. Das Pulsechoverfahren beschreibt das alternierende Umschalten des Elements in Sende- und Empfangsbetrieb⁸⁷. Die Ausbreitung der Schallwellen ist an Materie gebunden^{78, 87}, wobei die Materialteilchen in Längsrichtung zur Ausbreitung des Schalls um ihre

Ruhelage (Longitudinalwellen) schwingen⁸⁷. Die intermittierende periodische Kompression und Dekompression der Teilchen charakterisieren die Ausbreitung des Schalls⁸⁷.

Die Schallgeschwindigkeit (Tab. 1) hängt von den Mediumeneigenschaften Dichte und Kompressibilität ab. Je dichter ein Medium ist, umso schneller erfolgt die Ausbreitung^{78, 87}.

Die Wellenlänge beschreibt den kleinsten Abstand zwischen zwei gleichartigen Erregungszuständen und ist abhängig von der Schallgeschwindigkeit und der Frequenz⁸⁷.

An der Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Eigenschaften werden die Schallwellen zum Teil transmittiert und reflektiert⁸⁷. Die Dichteunterschiede (Impedanzsprünge) der verschiedenen Gewebe führen zu unterschiedlichen Reflexion⁷⁸. Treffen die Schallwellen auf freie Partikel, deren Größe gleich oder kleiner als die Größe der Wellenlänge sind, tritt eine Streuung ein⁸⁷. Je höher die Impedanzsprünge sind, desto schlechter erfolgt die Weiterleitung im Gewebe⁷⁸. Zwischen Luft und Gewebe kommt es zur vollständigen Reflexion⁸⁷, daher wird für die akustische Ankopplung ein Ultraschallgel aufgetragen^{87, 78}.

Medium	Dichte [kg/m ³]	Schallgeschwindigkeit [m/s]	Akust. Impedanz [kg/s·m ²]
Luft (0°)	0,0012	331	0,0004
Wasser(37°)	0,997	1526	1,53
Knochen	1,85	3600	6,66
Blut	1,02	1562	1,60

Tab. 1: Auflistung einiger, für den Ultraschall relevanter, physikalischer Größen ausgewählter Medien⁸⁸

Trifft der Schall schräg auf eine akustische Grenzfläche, wird er gebrochen und reflektiert. An gekrümmten Grenzflächen werden die transmittierenden Schallwellen entweder fokussiert oder defokussiert. Dies hängt von der Mediendichte ab⁸⁷. Gewebshomogenitäten bewirken Beugungen⁸⁷.

Die akustische Impedanz (Tab. 1) ist das Produkt aus Schallgeschwindigkeit im Medium und Dichte des Mediums⁸⁷.

Schwingungen und Wellen können sich überlagern und gegenseitig beeinflussen (Interferenz), wobei es dabei zur Auslöschung oder Verstärkung kommt⁸⁷.

Bedingt durch Dämpfung durchdringt nur ein Teil der Energie die Materie. Nimmt die Schichtdicke zu, verringert sich die Schallintensität und die Schallfeldgröße. Diese Absorption ist material- und frequenzabhängig. Bei hoher Frequenz ist aufgrund der hohen Absorption die Eindringtiefe geringer. Technisch wird dies durch erhöhte Sendeenergie und Empfangsverstärkung kompensiert⁸⁷.

2.8.2. Technische Grundlagen

Die Resonanzfrequenz des Piezoelements wird von seiner Dicke bestimmt. Nach Möglichkeit stimmt sie mit der gewünschten Sendefrequenz überein. Erzeugt wird stets ein Frequenzspektrum, dessen Mittenfrequenz der Nennfrequenz entspricht⁸⁷. Je höher die Mittenfrequenz, desto höher ist die axiale Ortsauflösung. Das Schallfeld, welches sich aus einem Hauptschallbündel mit mehreren Nebenmaxima zusammensetzt^{44, 87}, besteht aus einem inhomogenen Nahfeld und einem homogenen Fernfeld, dessen Druckamplitude fortlaufend abnimmt. Diese exponentielle Intensitätsabnahme wird durch die elektronische laufzeitabhängige Verstärkung der Druckamplituden kompensiert⁸⁷. Durch eine Fokussierung wird der Schallfelddurchmesser verkleinert und die laterale Ortsauflösung verbessert. Diese ist abhängig von der Frequenz und dem Kristalldurchmesser^{44, 87}.

2.8.3. Technische Anwendungen

Bei dem *A-Mode-Verfahren* erhält man keine anatomischen Bilder. Die unterschiedlichen Gewebisdichten werden graphisch als Amplituden dargestellt^{44, 87}.

Im *B-mode-Verfahren* werden in Echtzeit zweidimensionale Bilder der Grenzflächen generiert^{44, 87}. Um eine Bildinformation zu erhalten, werden die empfangenen Echos komprimiert und Graustufen zugeordnet⁸⁷. Je größer die Amplitude, desto heller ist ein Bildpunkt^{44, 87}.

Das Bild beim *M-Mode-Verfahren* wird durch eine zeitliche Anordnung generiert und findet Anwendung zur Darstellung dynamischer Prozesse^{44, 87}.

Bewegt sich eine Schallquelle, so wird die von einem nichtbewegten Beobachter wahrgenommene Frequenz je nach Richtung höher oder niedriger. Dieser Dopplereffekt kann zur Flußgeschwindigkeitsmessung verwendet werden. Der Winkel der Schallquelle zum beschallten Gegenstand bestimmt die Höhe der Frequenzverschiebung^{44, 87}.

Bei dem *cw-Dopplerverfahren* wird dem hochfrequenten Ultraschallimpuls ein niederfrequentes Doppler-Signal aufgeprägt. Über eine Frequenzmodulation wird dieses abgetrennt und über einen Lautsprecher übertragen⁸⁷.

Bei dem *farbkodierten Duplexverfahren* erkennt man neben der Morphologie Farbwerte, welche die Flussrichtung/-geschwindigkeit darstellen^{44, 87}.

Das *Power-Doppler-Verfahren* beinhaltet lediglich die farbkodierte Wiedergabe der Doppler-Signal-Intensität⁸⁷.

Neben der diagnostischen Bildgebung in Bereichen der Kardiologie oder zur Ermittlung des Gefäßstatus in neurologischen Fragestellungen wird Ultraschall auch therapeutisch bei der Lithotripsie¹⁴⁶ oder auch bei der Phakoemulsifikation¹³⁰ eingesetzt.

Bei bestimmten Indikationen werden Echosignalverstärker (Tab. 2) eingesetzt. Dadurch erhält man ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis¹²⁹. Dabei handelt es sich um gashaltige Mikrobläschen^{75, 129}. Die akustische Impedanz von Gas ist niedriger als die von Blut, wodurch es an der Grenzfläche zu einer Reflexion kommt⁷⁵. Die Signalamplitude wird bestimmt durch die Dichte des Bläscheninhalts und des Umgebungsmediums sowie der Frequenz⁷⁵.

Handelsname	Hülle	Gas
SonoVue®	Phospholipid	Sulfurhexafluorid
Optison®	Albumin	Perfluoropropan
Echogen®		Dedecafluorpentan
Levovist®	Galaktose und Palmitinsäure	Luft
Echovist®	Galaktose	Luft

Tab. 2: Auflistung der Zusammensetzung von auf dem Markt befindlichen Echokontrastverstärkern

2.8.4. Biologische Wirkungen

Bei der Verwendung von Ultraschall gelangt die Energie in Form eines Druckpulses in den Körper. Ein Teil, welcher nicht als Echo den Organismus verlässt, wird absorbiert^{44, 90}. Dies führt zu einem Energiegradienten in Ausbreitungsrichtung des Schallfeldes⁹⁰. In Strömungsversuchen stellt sich dieses Phänomen (acoustic streaming) als Fluss des Mediums parallel zum Schallfeld dar¹⁴⁴. Dies kann zu möglichen biologischen Wirkungen führen⁹⁰.

Werden kleine Gegenstände in das Schallfeld eingebracht, entstehen durch Reibungskräfte an der Gegenstand-Medium-Grenze zirkuläre Schwingungen (Microstreaming), welche in ihrer räumlichen Ausdehnung begrenzt sind⁹⁰.

In der Dekompressionsphase des Ultraschalldruckpulses entsteht ein Unterdruck⁴⁴. Durch Verminderung des Drucks bei konstanter Temperatur können Gasblasen im Körper entstehen⁴⁴ (Kavitation). Das Verhalten dieser Blasen hängt von verschiedenen Faktoren (Länge des Ultraschallpulses, Oberfläche und Volumen der Bläschen) ab⁴⁴. Kommt es zum Kollabieren der Bläschen, wird ortsgebunden die gesamte Energie freigesetzt und eine starke lokale Temperaturerhöhung ist die Folge⁴⁴.

Durchläuft die Druckwelle den Körper, erfahren die Teilchen im Organismus eine Bewegung. Diese Bewegungsenergie wird in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben⁴⁴.

Bei entsprechender Einstellung des Ultraschallgerätes können die Bläschen des Echokontrastmittels in Schwingungen versetzt bzw. zum Platzen gebracht werden⁶⁰. Durch diese „Bursts“ kommt es lokal zur Freisetzung mechanischer Energie.

III. Zielsetzung

Die Sonothrombolyse beschreibt ein Verfahren, bei dem mittels Ultraschallbehandlung eine Thrombolyse herbeigeführt wird¹¹³. Zahlreiche Studien, in vitro und im Tiermodell belegen die Wirksamkeit bei Myokardinfarkten¹³⁶, bei peripheren Gefäßverschlüssen^{83, 88, 148} sowie bei der transkraniellen Applikation in vitro^{1, 14}, wobei unterschiedliche Ultraschallfrequenzen (20 KHz bis 2 MHz) und unterschiedliche Ultraschallenergien (0.3 W/cm² bis 35 W/cm²) verwendet wurden.

Das Ausmaß des thrombolytischen Effekts von Ultraschall ist abhängig von der Intensität und Frequenz. In verschiedenen in-vitro-Experimenten konnte gezeigt werden, dass niederfrequenter Ultraschall (20 KHz bis 0.5 MHz) in Kombination mit rt-PA ein höheres lytisches Potential aufweist, als der für diagnostische Anwendungen eingesetzte hochfrequente Schall (1 - 11 MHz). Weiterhin konnte belegt werden, dass bei konstanter Frequenz die thrombolytischen Eigenschaften mit ansteigender Ultraschallenergie zunehmen^{15, 20, 32, 43, 50}. Ultraschall extrem niedriger Frequenz und hoher Energie (z.B. 20 kHz; 8-23 W) kann neben einer mechanischen Zerstörung von Thromben auch zu ausgeprägten thermischen Effekten führen^{8, 76}. Wichtig für therapeutische Anwendungen in der Neurologie ist die Tatsache, dass niederfrequenter Ultraschall bei transkranieller Anwendung eine geringere Abschwächung durch die Schädelkalotte erfährt, als hochfrequenter Ultraschall^{15, 32}. Eine klinische Studie, ohne vorangegangener tierexperimenteller Überprüfung, musste jedoch abgebrochen werden, weil bei den mit 300 kHz beschallten Patienten ein erhöhtes Auftreten von massiven intrazerebralen Blutungen selbst in der contralateralen Hemisphäre beobachtet wurde^{33, 46}.

Ultraschallanwendungen mit hoher Frequenz und niedriger Energie, wie sie auch zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden, zeigten bereits bei sehr kleinen Patientenzahlen eine überraschende Verbesserung der Rekanalisationsquote und auch des klinischen Outcome sowohl mit, als auch ohne begleitende systemische rt-PA-Applikation^{4-6, 27, 39}.

Bei der Entwicklung eines therapeutischen Ultraschallverfahrens zur Anwendung beim ischämischen Schlaganfall lassen sich demnach zwei Ansatzpunkte verfolgen: Die Entwicklung eines niederfrequenten Ultraschalls, dessen technische Parameter

der Indikation entsprechend spezifiziert wurden, oder die Umwidmung von bereits entwickelten hochfrequenten diagnostischen Geräten, deren Einstellungen zum Therapiezweck nutzbar gemacht werden.

Weiterhin kann die Ultraschallapplikation mit thrombolytisch wirksamen Substanzen kombiniert werden^{6, 40}, um die Rekanalisierungsrate zu verbessern. Die zusätzliche Gabe von Echosignalverstärkern kann diesen Effekt weiter verstärken^{102, 121}. Verschiedene Studien haben einen wirksamkeitsverbessernden Effekt des Echosignalverstärkers SonoVue® und rt-PA auf die Sonothrombolyse gezeigt^{111, 149}. Diese intravaskuläre Wirkverbesserung kann dazu beitragen, die Schallenergie gering zu halten, was sich wiederum günstig auf das Nebenwirkungsprofil auswirken kann.

Zusammenfassend lassen sich somit bei der Entwicklung eines transkraniellen Ultraschallverfahrens folgende Probleme benennen:

- aufgetretene Nebenwirkungen in klinischen niederfrequenten Studien
- zu der Verträglichkeit von therapeutischem Ultraschall sind nur geringe Datenmengen verfügbar
- für die Schlaganfalltherapie werden andere Schallprotokolle angewendet als für die Zulassung der diagnostischen Geräte geprüft wurden
- Hinweise, dass reperfundiertes ischämisches Gewebe, bedingt durch die erhöhte Permeabilität der Gefäße, für eine sekundäre Hirnblutung empfänglich ist^{74, 101, 152}

Daraus resultiert die zwingende Notwendigkeit präklinischer, experimenteller Arbeiten, um mögliche Schädigungen und therapeutische Möglichkeiten zu bestimmen.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es daher, durch die Gegenüberstellung eines 60 kHz- und eines 3 MHz-Beschallungsprotokolls von Ratten mit zerebraler Ischämie, bei einem permanenten und transienten Modell, mögliche unerwünschte Nebenwirkungen durch histologische und bildgebende Verfahren zu analysieren. Anhand der Ergebnisse von intrakranieller Temperaturmessung, neurologischem

Outcome, Läsionsvolumen und der Ermittlung von Blutungskomplikationen sollte der mögliche therapeutische Nutzen einer Methode erfasst werden.

Die gewonnenen Daten lieferten Hinweise auf eine therapeutische Wirkung bei der Anwendung von 3 MHz im transienten Modell, also nach erfolgter Reperfusion der Arteria cerebri media. Weitergehendes Ziel war daher die Evaluation therapeutischer Effekte mittels Micro- und Nano-CT-Untersuchungen auf der Ebene der zerebralen Mikrozirkulation.

IV. Material und Methodik

4.1. Materialien

4.1.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

- Isotonische NaCl-Lösung 0,9 % (B. Braun AG, Melsungen)
- Formalinlösung (4,5%; Roti[®] Histofix; Roth; Karlsruhe)

4.1.2. Medikamente

- Forene[®] (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Actilyse[®] (Boehringer Ingelheim, Ingelheim)
- SonoVue[®] (Bracco Resaerch S.A., Plan-les-Ouates, Geneva, Schweiz)

4.1.3. Operationszubehör

- Chirurgisches Nahtmaterial (Perma-Hand®Seide; Ethicon GmbH, Norderstedt)
- Chirurgisches Operationsbesteck (Aesculap® AG und CO.KG, Tuttlingen)
- Lineal
- Silikonbeschichtete Fäden (Eigenherstellung):

Aus den Fäden (Ethilon®, Ethicon GmbH, Norderstedt) wurden mehrere kleinere Fäden mit einer Länge von ca. 3,5 cm hergestellt. Anschließend wurde ein Ende der Fäden mit Hilfe eines LötKolbens erhitzt, so dass eine abgerundete, verbreiterte Spitze entstand. Danach wurden sie mit Silikon (Provil® novo Light, Base und Catalyst; Heraeus, Deutschland) beschichtet und nach einer Trockenzeit von 24 h auf eine Länge von 3 cm gekürzt.

- Spritzen zu 1, 2 und 5ml (B Braun, Melsungen)
- Venenverweilkatheter Vasofix Braunüle 22 G (B Braun, Melsungen)
- Stoppuhr (CG-501, Conrad Electronics)
- Vinyl-Handschuhe, unsteril, puderfrei Peha Polysoft (Hartmann)
- Watteträger (Heiland)
- Clinitubes 100µl (Radiometer, Copenhagen)

4.1.4. Versuchstiere

8-9 Wochen alte Wistar-Unilever-Ratten mit einem Gewicht zwischen 300 und 350g (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln)

4.1.5. Geräte

- Blutgasanalysegerät (Radiometer ABL510, Radiometer GmbH, Willich-Schiefbahn)
- Waage (BP 3100S; Sartorius AG, Göttingen)
- Blutdruckmessgerät (Hellige Sevomed)
- Wärmelampe
- 60 kHz-Apparatur (BANDELIN electronic, Berlin, Germany)
- 3 MHz-Apparatur (Sonos 7500, Philips Ultrasound Systems, Bothell, WA, USA)
- Druckwandler
- Isofluranverdampfer (Sigma Elite Vaporizer; Penlon, Abingdon, UK)
- Operationsmikroskop OPMI mit fahrbarem Bodenstativ S100 (Zeiss; Oberkochen)
- rektale Temperatursonde
- thermostatisch regulierendes Wasserfluss-System (Haake B3/C10; Haake)
- Wärmebrettkonstruktion mit einem Warmwasserdurchlauf mit eingebauter Narkosemaske (Eigenbau des Institutes)

4.1.6. Hard- und Software

- DELL-Rechner
- Bildanalyse-Software (Image J 1,38 x; National Institutes of Health, USA)

4.1.7. Magnetresonanztomographie

- Atemdrucksonde
- Hard- und Software:
- Silicon Graphics-Rechner
- Paravision 4.0
- Kernspintomograph (Bruker PharmaScan 70/16, 7.0T, 16cm; Ettlingen, Deutschland)
- Rattenkunststoffhalterung mit Narkosezu- und ableitung (Eigenbau des Instituts)
- Rektale Temperatursonde
- thermostatisch regulierendes Wasserfluss-System (Haake)
- Volumenresonator

4.1.8. Gewebeuntersuchung

- Gefrierschrank (AEG)
- Präparationsbesteck (Aesculap[®] AG und CO.KG, Tuttlingen)
- Parafilm „M“ (Peching Plastic packaging, Chicago)
- Rasierklingen (Techni Edge[®]; USA)
- Vinyl-Handschuhe, unsteril, puderfrei (Transaflex; Bremen)

4.2. Methodik

4.2.1. Versuchstiere

Für das Versuchsvorhaben wurden männliche Wistar-Unilever-Ratten im Alter von 8 bis 9 Wochen und einem Gewicht zwischen 300 und 350g von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen) bezogen. Die Tiere wurden in Gruppen zu fünf Tieren in Makrolonkäfigen vom Typ IV gehalten und erhielten Wasser und ein Alleinfuttermittel (Altromin®) ad libitum.

4.2.2. Narkose

Alle Operationen wurden unter Isofluran-Narkose bei erhaltener Spontanatmung durchgeführt. Die Narkose wurde eingeleitet mit 5% Isofluran bei 1 l/min Druckluft. Die Erhaltung der Narkose während der Operation erfolgte über eine Kopfmaske und wurde bei 2-3% Isofluran in 0,5 l/min Druckluft bedarfsgesteuert. Während der operativen Eingriffe und der Ultraschall-Behandlung wurden der Blutdruck und die Körpertemperatur überwacht. Diese wurde konstant bei 37°C mittels eines wasserbeheizten OP-Tisches gehalten.

4.2.3. Operationstechniken

4.2.3.1. Fadenmodell - Permanenter Verschluss der A. cerebri media

Nach erfolgreicher Narkoseeinleitung wurde das Tier in Rückenlage positioniert. Anschliessend wurde der ventrale Halsbereich geschoren und desinfiziert. Nach einer medianen Längsinzision der Haut von ca. 2 cm und der Präparation der Muskeln wurde die rechtsseitige A. carotis communis freigelegt und die A. carotis interna sowie die A. carotis externa dargestellt. Die A. carotis externa wurde an ihrem Ursprung an der Bifurkation permanent mit einem 4-0 Faden ligiert. Die A. carotis communis wurde distal ebenfalls permanent und die A. carotis interna transient ligiert. Nach einer Arteriotomie wurde ein 30 mm langer mit Silikon beschichteter 4-0 Nylonfaden in die A. carotis communis, bis ein leichter Widerstand zu spüren war,

eingeführt. Der Widerstand markiert die Abzweigung der A. cerebri anterior und blockiert somit den Blutfluss in die A. cerebri media an dieser Stelle. Dies war bei einer Eindringtiefe des Fadens von durchschnittlich 19-21 mm, gemessen ab der Carotis-Bifurcation, der Fall. Das Filament wurde mit einer Ligatur in Position gehalten. Die Hautnaht erfolgte mittels fortlaufender Naht⁸⁰.

Nach Beendigung der Operation wurden die Tiere bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose gewärmt und in einen separaten Käfig gesetzt.

4.2.3.2. Fadenmodell - Ischämie-Reperusionsmodell

Bei der Durchführung des Ischämie-Reperusionsmodells wurden die Tiere nach 85 Minuten erneut in Narkose gelegt und die Hautnaht eröffnet. 90 Minuten nach der Positionierung des Filaments wurde dieses aus dem Gefäß herausgezogen und die A. carotis communis permanent ligiert. Es erfolgte ein erneuter Wundverschluss.

4.2.4. Vorbereitung für 60 kHz-Beschallung

Das Tier wurde wie oben beschrieben anästhesiert und in Bauchlage gebracht. Es erfolgte eine Längsinzision und Mobilisation der Schädelhaut. Diese wurde an einem Metallring mit 40 mm Durchmesser, in einer Höhe von 10 mm über der Schädelkalotte mit Einzelheften befestigt. Die so entstandene "Mulde" wurde mit Wasser zu Injektionszwecken gefüllt. Die an einem Stativarm befestigte Ultraschallsonde mit einer planen kreisförmigen Fläche von 3,5 cm² wurde in das Mulde eingetaucht und 5 mm über dem Schädelknochen positioniert (Abb. 5).

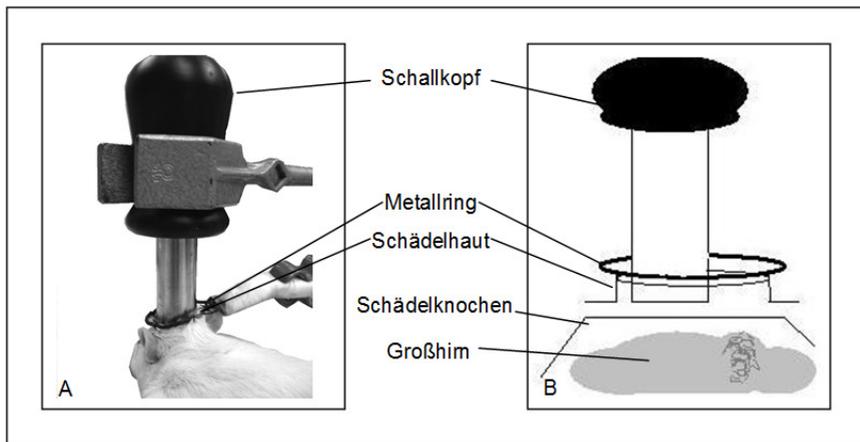


Abb. 5: A) Fotografie des technischen Aufbaus, B) schematische sagittale Darstellung

4.2.5. Einstellungen des 60 kHz-Gerätes

Die einstündige Beschallung wurde mit einer Intensität von $0,2 \text{ W/cm}^2$ (time average (ITA)) durchgeführt. Dies wurde mittels eines angeschlossenen Messgerätes kalkuliert und kontrolliert. Es wurde ein duty cycle (Puls-Pausen-Verhältnis) von 50% und eine Pulsrate von 10 Hz gewählt. Dies entspricht während der An-Phase einer Intensität von $0,4 \text{ W/cm}^2$. Basierend auf kalometrischen Messungen betrug die zeitlich gemittelte akustische Intensität $0,14 \text{ W/cm}^2$.

Der Ultraschall wurde innerhalb von 10 Minuten viermal für 2 min, jeweils gefolgt von einer 30 Sekunden langen Pause, eingeschaltet. Dann erfolgte eine 5 minütige Pause. Dieser 15 Minuten Zyklus (Abb. 6) wurde 4 Mal wiederholt. Durch die intermittierende Beschallung ergab sich eine Gesamt-Beschallungszeit von insgesamt 32 Minuten während der einstündigen Behandlung.

Durch den gewählten Aufbau wurde eine Beschallung des gesamten Schädels und Gehirns erreicht. Dies ermöglichte eine genaue Beurteilung der Schallauswirkungen auf die ischämischen sowie auf die nicht-ischämischen Gehirnareale.

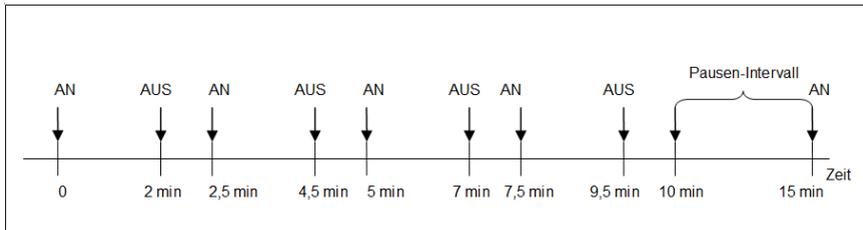


Abb. 6: Schematische Darstellung des 15-Minuten-Intervalls, das viermal in Folge wiederholt wurde

4.2.6. Vorbereitung für 3 MHz-Beschallung

Das, wie oben beschriebene, anästhesierte Tier wurde in Bauchlage gebracht. Mit einer Enthaarungscreme wurde das gesamte Fell über dem kaudalen Anteil des Os frontale und über dem gesamten Os parietale entfernt. Eine mit Ultraschallgel gefüllte Vorlaufstrecke wurde über dem Schädel positioniert. Die an einem Stativarm befestigte Ultraschallsonde wurde in einem Abstand von 40 mm über dem Schädel in das Gel eingebracht (Abb. 7).

4.2.7. Einstellungen des 3 MHz-Gerätes

Für die Beschallung wurde eine kommerzielle 3 MHz-Sonde (S3-Schallkopf) gewählt. Es wurde im B-Mode-Verfahren mit eingeschalteter Farb-Doppler-Funktion verwendet. Die maximale Ausgangsleistung wurde so eingestellt, dass ein mechanischer Index von 1,7 erreicht wurde. Mittels einer Einstellung für das Probenvolumen von 0,57 cm wurde der Schallstrahl im Gehirn fokussiert. Es wurde eine kontinuierliche Beschallung von 65 Minuten Dauer durchgeführt.

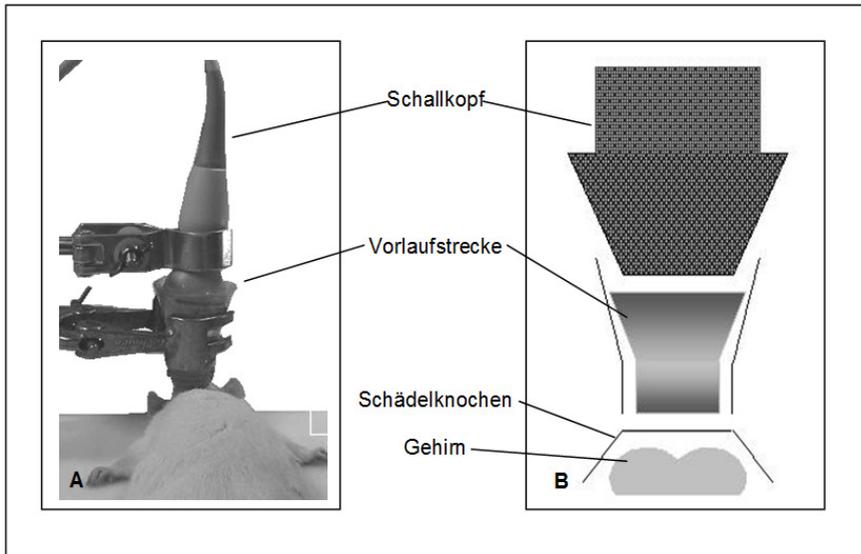


Abb. 7: A) Fotografie des technischen Aufbaus, B) schematische koronare Darstellung

4.2.8. Testsubstanzen und Applikationsart

4.2.8.1. rt-PA

rt-PA wurde über einen in die V. coccygea lateralis gelegten Venenverweilkatheter appliziert. Bei einer Gesamtdosis von 10 mg/kg Körpergewicht wurden 10% als Bolus zu Beginn der Behandlung verabreicht und der Rest als Infusion (0,2 ml/min) über eine Stunde während der Ultraschallbehandlung.

4.2.8.2. Mikrobläschen

Über einen in die V. coccygea lateralis gelegten Venenverweilkatheter wurden dem Tier 10 μ l einer kommerziellen Standardlösung (SonoVue[®]: 8 μ l Mikrobläschen/ml) gelöst in 90 μ l physiologischer Kochsalzlösung verabreicht. Die Gabe der Mikrobläschen erfolgte zum unmittelbaren Beginn der Ultraschallbehandlung, nach 20, 40 und abschliessend nach 60 minütiger Beschallung. Die gewählte Dosierung entspricht der beim Menschen verabreichten Menge, bezogen auf das Blutvolumen.

4.2.9. Physiologische Parameter

4.2.9.1. Blutentnahme und Analyse

Für einen arteriellen Zugang wurde die linke A. femoralis gewählt. Diese wurde durch einen Hautschnitt in der Leiste dargestellt und distal permanent sowie proximal temporär mit einem 4-0 Faden ligiert. Durch eine Arteriotomie wurde ein mit heparinierter Kochsalzlösung gefüllter Polyethylenkatheter (Innendurchmesser: 0,38 mm, Außendurchmesser: 1,09 mm) in das Gefäß eingeführt. Nach Öffnung der temporären Ligatur wurde dieser ca. 2,5 cm vorgeschoben und mittels einer Ligatur fixiert. Dieser Katheter ermöglichte eine Blutentnahme mit Hilfe einer heparinisierten Kapillare von jeweils 100 µl für die Blutgasbestimmung sowie die kontinuierliche arterielle Blutdruckmessung. Nach Beendigung der Blutdruckmessung erfolgte die Entfernung des Katheters und die Ligation des Gefäßes mit einem 4-0 Faden, um Blutungen zu vermeiden. Die Haut wurde mit U-Heften verschlossen.

4.2.9.2. Blutgase und Blutdruck

Die Analyse der Blutproben wurde mit einem Blutgasanalysegerät (ABL 500, Radiometer) durchgeführt. Dabei erfolgte eine temperaturkorrigierte Bestimmung des pH-Wertes, des O₂- und des CO₂-Partialdrucks.

Der Blutdruck wurde in der A. femoralis kontinuierlich mit Hilfe eines Blutdruckmessgerätes (Hellige Sevomed) und eines Druckwandlers gemessen. Der arterielle Mitteldruck wurde zu definierten Zeitpunkten protokolliert.

4.2.10. Zerebrale Temperatur

Um die zerebrale Temperaturentwicklung während der Ultraschallbehandlung zu ermitteln, wurden zusätzliche Tiere operiert. Gefäßokklusion sowie die gewählten Beschallungsparameter entsprachen dem jeweiligen Protokoll. Bei diesen Tieren wurde vor der Beschallung eine intrakranielle Temperatursonde in das Einstromgebiet der A. cerebri media implantiert, um Temperaturveränderung im Verlauf der Beschallung zu registrieren.

4.2.10.1. Sondenpositionierung bei 60 kHz

Dem anästhesierten Tier wurde nach der Reperfusion mittels Längsinzision der Schädelknochen freipräpariert. 2 mm kaudal des Bregmas und 2 mm rechts der Sutura sagittalis wurde ein Loch mit 2 mm Durchmesser in den Schädelknochen gefräst. Die Schädelhaut wurde wie zur Beschallung am Metallring fixiert und durch eine Perforation in der kaudalen Fläche die Temperatursonde durchgeführt und 5 mm tief in den eröffneten Schädel nach kranioventral positioniert. Im Anschluss erfolgte die Beschallung. Danach wurde das Tier durch Dekapitation getötet.

4.2.10.2. Sondenpositionierung bei 3 MHz

Dem anästhesierten Tier wurde nach der Reperfusion mit einem keilförmigen Hautschnitt der Schädelknochen freipräpariert. 2 mm kaudal des Bregmas und 2 mm rechts der Sutura sagittalis wurde ein Loch mit 2 mm Durchmesser in den Schädelknochen gefräst. Die Temperatursonde wurde 5 mm tief in den eröffneten Schädel nach kranioventral positioniert (Abb. 8). Im Anschluss wurde die Haut mit einer fortlaufenden Naht vernäht und die Beschallung durchgeführt. Danach wurde das Tier durch Dekapitation getötet.

4.2.11. MRT-Technik

4.2.11.1. Fixierung der Versuchstiere

Entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll wurden MRT-Untersuchungen durchgeführt. Das verwendete Narkoseregime entsprach dem für die Operationen gewählten Protokoll, wobei die Atmung für den gesamten Untersuchungszeitraum mit



Abb. 8: Fotografie der Positionierung der Temperatursonde

Hilfe einer unter der äußeren Thoraxwand angelegten Druckelektrode überwacht wurde. Die Narkose wurde so angepasst, dass die Atemfrequenz zwischen 50-70/min lag. Während der gesamten Versuchszeit wurde die Körperkerntemperatur mit einer rektalen Messsonde überwacht und mit einem thermostatisch reguliertem Wasserfluss-System bei 37 °C gehalten.

Die Tiere wurden in einer speziell konstruierten Halterung fixiert. Die oberen Schneidezähne wurden in einem Kunststoffhalter befestigt und der Kopf in einem konusförmigen Halter positioniert. Durch diesen Halter erfolgte die Narkosegaszu- und -abfuhr. Die Halterung wurde dann in einem linearpolarisierenden Volumenresonator mit einem Durchmesser von 60 mm platziert und im Anschluss wurde das gesamte Tier in dem Kernspintomographen platziert. Tuning und Matching erfolgten manuell.

4.2.11.2. Der Magnetresonanztomograph

Der Magnetresonanztomograph (Bruker PharmaScan 70/16, 7.0T, 16 cm; Ettlingen, Deutschland) (Abb. 9) arbeitet mit 300,51 MHz für das Isotop ^1H und ist mit einem allseits abgeschirmten Gradientensystem (300 mT/m) ausgestattet.

4.2.11.3. Bildgebung

4.2.11.3.1. Localizer

Eine grobe Positionierung der Versuchstiere im Magnetfeld wurde anhand einer Spinecho-Sequenz mit Repetitionszeit (TR) = 150 ms, Echozeit (TE) = 12 ms und einer Schichtdicke von 4 mm durchgeführt. Drei orthogonale Schichten (axial, koronar und sagittal) erlaubten dabei die Beurteilung der Position des Schädels im dreidimensionalen Raum. Durch Verschieben oder Drehen des Resonators wurde die Positionierung der Tiere entsprechend optimiert.

4.2.11.3.2. Feinjustierung

Zur Quantifizierung des rechten und linken Hemisphärenvolumens sowie zur Beurteilung von Mittellinienverlagerungen war eine exakte Positionierung der Versuchstiere im Magnetfeld notwendige Voraussetzung (s.u.). Zum Ausgleich geringer Abweichungen von einer streng koronaren Schnitfführung wurden daher mehrfach RARE- (Rapid acquisition with relaxation enhancement) Sequenzen abgeleitet. Sie erlaubten eine präzise Beurteilung der Positionierung. Es handelte sich um eine T2-gewichtete Sequenz mit geringer Schichtdicke und sehr kurzer Messzeit (TR = 2500 ms, TE = 41.8 ms, Schichtdicke: 1 mm). Für eine exakte koronare Ausrichtung der Schnitfführung wurde eine Winkelkorrektur durchgeführt und diese durch eine weitere RARE-Sequenz überprüft. Dieses Verfahren wurde ggf. wiederholt, bis eine optimale Positionierung erreicht war.

4.2.11.3.3. Diffusionsgewichtete Bildgebung

Zur topographischen Erfassung des Diffusionskoeffizienten des Wassers (ADC) wurden diffusionsgewichtete Bilder mit einer fettunterdrückenden Echo-Planar-imaging (EPI) -Sequenz erfasst. Vor Akquisition der ersten Diffusionsserie wurde zur Optimierung der Bildqualität ein so genannter Volumen-Shim mit einer volumenselektiven Doppel-Spinecho Spektroskopiesequenz (Repetitionszeit (TR) = 1s, Echozeit (TE) = 30 ms, Voxel-Größe $10 \times 8 \times 15 \text{ mm}^3$) durchgeführt. Die erreichte Halbwertsbreite des Wassersignals (FWHM), aufgenommen mit der Doppel-Spinecho Sequenz, betrug ungefähr 25-35 Hz. Im Anschluss wurden die ersten Diffusionsmessungen durchgeführt. Sechs aufeinander folgende koronare Schnitte

mit einer jeweiligen Dicke von 2mm wurden in einem field of view (FOV) von 32 x 32 mm und einer Matrixgröße von 128 x 128 (Repetitionszeit (TR) = 3003 ms, Echozeit (TE) = 38.6 ms, number of excitations (NEX) = 4) erfasst. Da lokale Feldinhomogenitäten Bildartefakte verursachen, wurde eine Fourfold-Segmentierung zur Minimierung des Effektes verwendet. Um eine quantitative Erfassung des Diffusionskoeffizienten des Wassers (ADC zu ermöglichen, wurden fünf Sätze koronarer Bilder mit unterschiedlichen Diffusionsgradientenwerten (10, 40, 70, 100 und 130 mT/m) aufgezeichnet. Mit einer Diffusionsgradientendauer (δ) von 9 ms und einer Gradientenseparationszeit (Δ) von 15 ms ergaben sich fünf b-Werte (6.96, 111.3, 340.8, 695.6 und 1175.5 s/mm²). Die Akquisitionszeit für die gesamte EPI-Sequenz betrug 4,5 Minuten.

Mit der Bildverarbeitungssoftware Paravision 4.0 (Bruker, Ettlingen, Deutschland) wurden anschließend topographische ADC-maps berechnet.

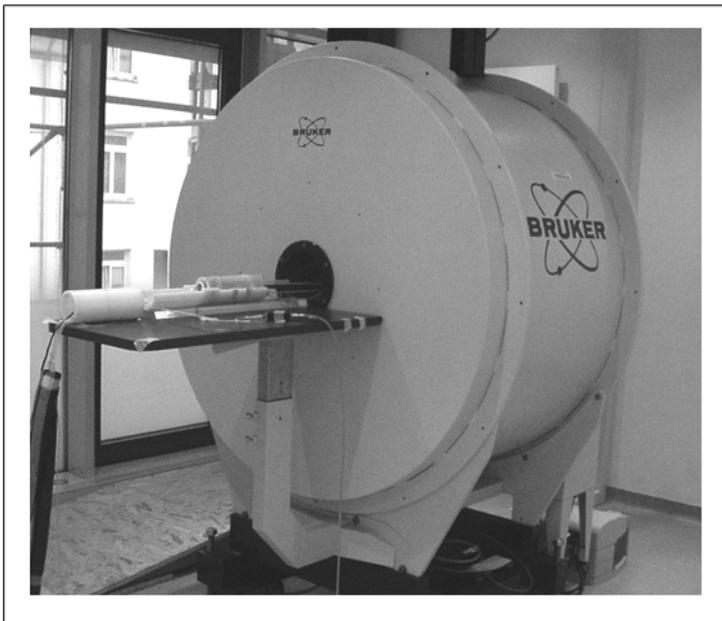


Abb. 9: Fotografie des MRT-Gerätes, Bruker PharmaScan 70/16, 7.0T

4.2.11.3.4. T2-Bildgebung

Die T2-Relaxationszeit wurde mit Hilfe einer CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill) Spinecho-Sequenz kartographiert. 6 Schichten mit einer Dicke von 2 mm wurden mit einem field of view (FOV) von 37 x 37 mm und einer Matrixgröße von 512 x 256 (Repetitionszeit (TR) = 3833,5 ms, 90° Anregungswinkel und 180° Refokussierungspuls, number of excitations (NEX) = 1) erfasst. 12 Echos wurden aufgenommen, angefangen mit TE = 18 ms (Schrittgröße $\Delta TE=18$ ms), was zu einer aufsteigenden Reihe von 18 bis 216 ms führte. Die Akquisitionszeit für die gesamte Sequenz betrug 16 Minuten und 21 Sekunden.

T2-maps wurden ebenfalls unter Verwendung der Bildverarbeitungssoftware Paravision 4.0 (Bruker, Ettlingen, Deutschland) berechnet.

4.2.11.3.5. T2*-gewichtete Bildgebung

Um intrazerebrale Blutungen zu detektieren, wurde eine schnelle Flash-T2*-Sequenz durchgeführt. 16 aufeinander folgende koronare Schichten mit einer Dicke von 1 mm ohne Zwischenschichtabstand wurden mit einem field of view (FOV) von 37 x 37 mm und einer Matrixgröße von 256 x 256 (Repetitionszeit (TR) = 43,4 ms, Echozeit (TE) = 7,0 ms, number of excitations (NEX) = 4) erfasst. Die Akquisitionszeit für die gesamte Sequenz betrug 12 Minuten und 7 Sekunden.

4.2.12. Computergestützte Auswertung

4.2.12.1. Planimetrie

Bei der T2-gewichteten Bildgebung stellten die hellen, signalintensiven Gebiete die Infarktareale dar. Unter Verwendung einer Bildanalyse-Software (Image J 1,38 x; National Institutes of Health, USA) wurden die Größen der beiden Hemisphären und des gesamten Infarktgebietes für jede koronare Schicht gemessen (Abb. 10).

Der prozentuale Anteil des Läsionsvolumens (%HLV) wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$\%HLV_u = (2 \times LV / (HVC + HVI)) \cdot 100$$

Die Gleichung beruht auf der Annahme, dass die kontralaterale Hemisphäre in dem gleichen Ausmaß komprimiert ist, wie sich die ipsilaterale Hirnhälfte ausdehnt, während das Hirnvolumen insgesamt gleich bleibt⁵⁶.

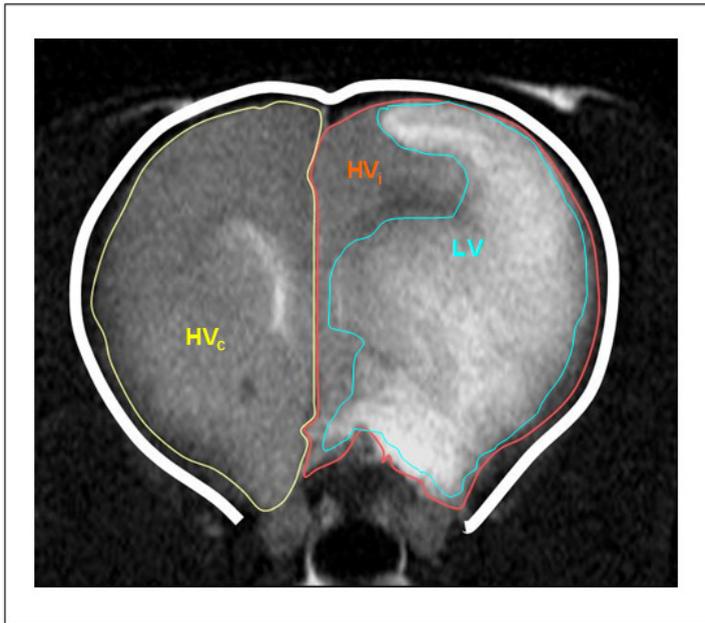


Abb. 10: Eine T2-Aufnahme vom Rattenhirn mit farblich umrandeten Hemisphären (HVi, HVc) und Läsionsbereich (LV)

Durch die Ausbildung des vasogenen Hirnödems kommt es zu einer Expansion des ischämischen Gewebes. Um die ödembedingte Größenzunahme des ischämischen Bereichs zu berücksichtigen, wurde das bisher unkorrigierte Läsionsvolumen (%HLVu) noch für den raumfordernden Effekt des Ödems korrigiert (%HLVe):

$$\%HLVe = ((HVC - HVi + LV) / HVC) \cdot 100$$

LV = das direkte Läsionsvolumen,

HVi = das ipsilaterale Hemisphärenvolumen

HVc = das kontralaterale Hemisphärenvolumen

Beide Volumina wurden durch eine Multiplikation aller Schichten mit 2 mm (Schichtdicke) und einer anschließenden Addition errechnet.⁵⁶

Die Messungen der Infarktgrößen erfolgten durch einen Untersucher, der für die Randomisierung der Versuchstiere und die klinischen Befunde geblendet war.

4.2.12.2. Bestimmung des ADC und der T2-Relaxationszeit

Unter Verwendung der Bildverarbeitungssoftware Paravision 4.0 wurden ADC und T2-Relaxationszeit in regions of interest (ROI) ermittelt. Die Positionierung der ROI wurde auf den erstellten ADC-maps festgelegt. Auf jeder Schicht, auf der eine ischämische Läsion aufzufinden war, wurde eine ROI im Zentrum des kortikalen und subkortikalen Anteils der Läsion, sowie in der kontralateralen Hemisphäre in der jeweils korrespondierenden Position platziert (Abb. 11). Schichten ohne ischämische Läsion wurden nicht berücksichtigt. Die Mittelwerte der ADC-Werte aller kortikalen und subkortikalen ROI wurden für beide Hemisphären ermittelt. Die Ermittlung der T2-Relaxationszeit wurde unter Verwendung der gleichen ROI-Positionen wie bei der ADC-Quantifizierung vorgenommen.

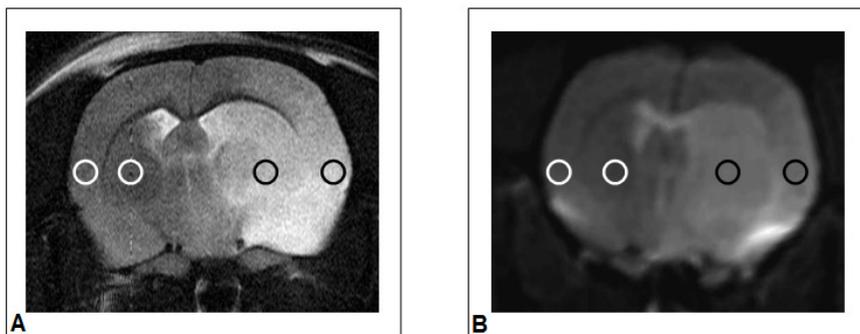


Abb. 11: Darstellung der Positionierung der ROI's in einer T2-gewichteten (A) und in einer ADC-gewichteten Aufnahme (B).

4.2.13. Klinisch-neurologische Beurteilung

4.2.13.1. Klinischer Score

Die klinisch-neurologische Untersuchung der Versuchstiere erfolgte zu definierten Zeitpunkten nach jeweiligem Versuchsprotokoll.

Klinischer Score	
<i>Vorderbeinflexion:</i>	
Flexion	10
Keine Flexion	0
<i>Instabilität bei einem lateralen Druck von beiden Seiten:</i>	
Normal	0
Reduziert	10
<i>“Tail hanging”(Ratte wird am Schwanz hochgehoben):</i>	
Normal	0
Hochwinden:	10
<i>Freies Laufen:</i>	
Normal	0
Abnormal	5
Unfähig zu laufen	10
<i>Bewegung der Tasthaare auf beiden Seiten:</i>	
Normal	0
Absent	10
<i>Bewusstsein:</i>	
Normal	0
Keine Reaktion auf den Stimulus	10
<i>Hören:</i>	
Normal	0
Unfähig	10
<i>Sinneswahrnehmung:</i>	
Normal	0
Keine Reaktion auf seitliche Berührung	10
<i>Sehvermögen (Hemianopsie):</i>	
Normal	0
Keine Reaktion auf eine Bedrohung von der Seite	10

Abb. 12: Darstellung des Score-Sheets für die neurologische Bewertung

Die neurologische Untersuchung erfolgte nach einer von Nedelmann und Mitarbeitern entwickelten Skala¹¹⁴ (Abb. 12). Durch Addition der einzelnen Punkte wurde die Gesamtpunktzahl ermittelt.

Zum Testen der *Vorderbeinflexion* wurden die Tiere am Schwanz etwa 20 cm über den Boden angehoben. Gesunde Ratten zeigten bei dieser Prozedur eine reflektorische Extension beider Vordergliedmaßen (Abb. 13A). Das Fehlen der Extension auf der linken Seite deutete auf das Vorliegen einer Hemiparese hin (Abb. 13B)

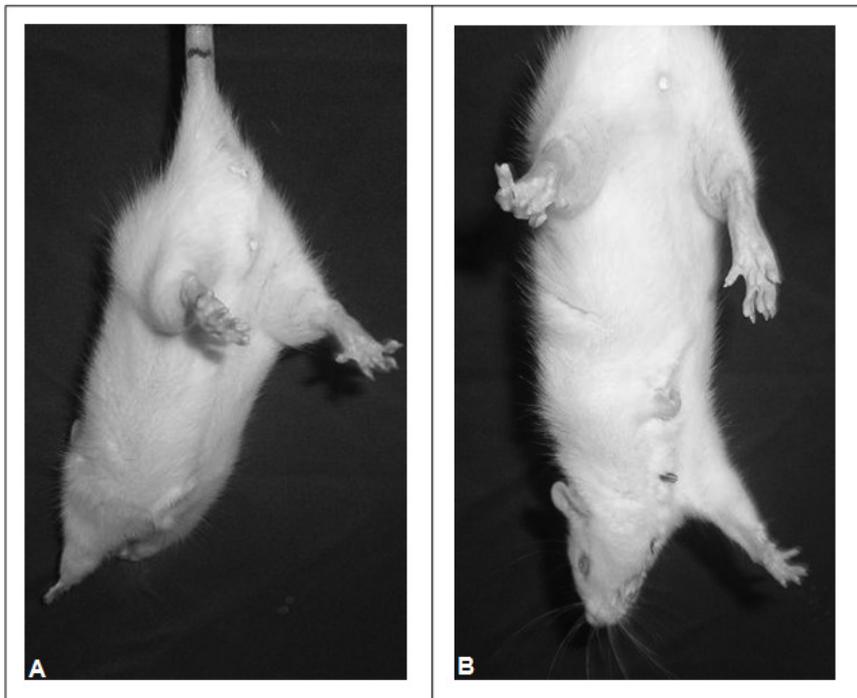


Abb. 13: Fotografie einer Ratte ohne (A) und mit Hemiparese des linken Vorderbeins (B)

Das Tier wurde danach auf eine ebene reizfreie Fläche gesetzt, um die *Instabilität* bei einem lateralen Druck von beiden Seiten zu ermitteln. Es wurde ein leichter, parallel

zum Boden gerichteter Druck, auf Höhe der Flanke der linken Seite ausgeübt. Gesunde Tiere lehnten sich dagegen.

Für die dritte Untersuchung, das so genannte „*Tail hanging*“, wurde das Tier weit proximal am Schwanz hochgehoben. Beeinträchtigte Tiere zeigten hier ein Hochwinden zur linken Seite und dortiges Verharren (Abb. 14). Punkte wurden vergeben, wenn dies bei dreimaliger Wiederholung positiv war



Abb. 14: Fotografie einer Ratte mit deutlichem "Tail hanging"

Im Anschluss wurde das Gangbild „*freies Laufen*“ auf einer ebenen reizfreien Fläche beurteilt. Gesunde Ratten zeigten immer eine ungerichtete Fluchtreaktion. Beeinträchtigte Tiere zeigten eine Gangabweichung nach rechts (Abb. 15). Bei einer starken hemisphäriellen Schädigung konnten die Tiere lediglich im Kreis mit dem Uhrzeigersinn laufen.

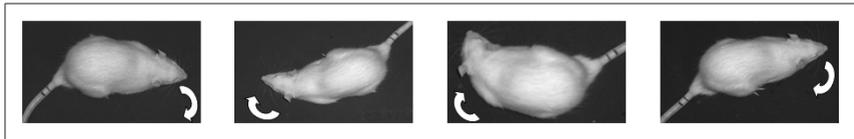


Abb. 15: Fotostrecke der Gangabweichung nach rechts.

Die Bewegung der *Tasthaare* beider Körperseiten wurde beurteilt.

Das *Bewusstsein* der Tiere wurde durch ihre Reaktion auf äußere Reize beurteilt. Es wurde bewertet, ob sie auf die Manipulationen und die Umgebungsreize tierspezifisch reagierten oder nicht.

Das *Hörvermögen* wurde durch einen kurzen akustischen Reiz (einmaliges Händeklatschen, 30 cm oberhalb des Tieres) getestet. Die physiologische Reaktion war eine Bewegung der Ohren zum Reiz hin.

Um die *Sinneswahrnehmung* der Tiere zu überprüfen wurden leichte taktile Reize rechts am seitlichen Körper verwendet. Tiere mit einer hemisphäriellen Schädigung reagierten nicht.

Das *Sehvermögen* der Ratten wurde anhand des Drohreflexes überprüft. Beeinträchtigte Tiere zeigten hierbei kein physiologisches Abwenden des Kopfes.

4.2.13.2. Rotarod-Test

Für diesen Test wurden die Ratten im untrainierten Zustand auf das laufende Rotarod platziert (Abb. 16). Die Drehgeschwindigkeit des Laufrades wurde kontinuierlich erhöht und die Umdrehungszahl pro Minute notiert, bei der das Tier nicht mehr mithalten konnte. Dieser Test wurde nach 24 Stunden wiederholt und die Differenz zum Vortag errechnet.

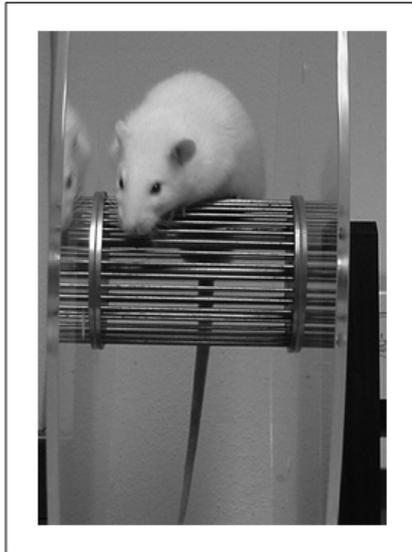


Abb. 16: Fotografie einer Ratte auf dem Rotarod.

4.2.14. Postmortale Untersuchungsmethoden

4.2.14.1. Probenentnahme für Histologie

Die Tiere wurden 24 Stunden nach Beginn des Versuches getötet. Dazu wurde zunächst bei den Tieren eine tiefe Inhalationsnarkose eingeleitet (5% Isofluran in 3,0 l/min. Luft). Im Anschluss wurde eine Perfusionsfixation, bei welcher das Fixiermittel in den Blutstrom eingebracht wurde⁵⁴, durchgeführt. Dadurch werden alle Zellen eines Organs fast unmittelbar nach dem Abbruch der Sauerstoffversorgung getötet⁵⁴. Hierfür wurde das Tier in Rückenlage positioniert und der Thorax eröffnet. Der linke Herzventrikel wurde punktiert und physiologische Kochsalzlösung zwei Minuten lang eingespült, um das Blut auszuschwemmen. Das rechte Herzohr wurde eröffnet, um einen Abfluss zu gewähren. Im Anschluss wurde das Tier drei Minuten lang mit 4% Paraformaldehyd perfundiert. Danach wurde der Kopf abgesetzt und die Kopfhaut dorsal mit einer Mittellinieninzision von kaudal nach rostral eröffnet. Die Haut wurde nach lateral präpariert, um die Schädelkalotte freizulegen. Kaudal wurde das Os occipitale mit einer Knochenzange entfernt. Anschließend wurde das Os frontale

rostral mit einer Feinsäge durchtrennt. Mit der Knochenzange wurde die Kalotte entlang der Sutura interfrontalis vorsichtig vom Gehirn abgehoben und entfernt. Nach vorsichtiger Entfernung der Dura mater wurde das Gehirn mit Hilfe eines feinen Spatels herausgelöst. Das Gehirn wurde zur Immersion für zwei Tage in 4% Paraformaldehyd aufbewahrt und so für die histologische Aufbereitung vorbereitet¹¹².

Bei der visuellen Inspektion während der Gehirnentnahme wurde auf das Vorliegen von intrazerebralen oder subarachnoidalen Blutungen geprüft, welche als Ausschlusskriterien festgelegt wurden.

4.2.14.2. Histologische Aufbereitung

Nach einer zweitägigen Immersionsfixation in 4%igen Paraformaldehydlösung wurde das Cerebellum und der Bulbus olfactorius abgesetzt, das Gehirn quer halbiert und in eine Einbettkapsel überführt. Das Gewebe wurde über Nacht in Leitungswasser gewässert und anschliessend in einer aufsteigenden Isopropylalkoholreihe dehydriert⁵⁴. Es folgte eine dreimalige fünfzehnminütige Spülung in Xylol. Über Nacht wurde das Gewebe in flüssigem Paraffin im Trockenschrank bei 60°C inkubiert. Das Paraffin wird vom Gewebe unter Verdrängung des Lösungsmittels (Xylol) aufgenommen⁵⁴. Im Anschluss wurde das Gewebe in einem Paraffinblock eingebettet und mit einem Mikrotom 4µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf einen mit Albumin-Glycerin beschichteten Objektträger überführt. Vor dem Färbevorgang wurden die Schnitte in einer absteigenden Isopropylalkoholreihe entparaffiniert.

An den Gewebeschnittpräparaten wurde eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung durchgeführt. Bei dieser Routinefärbung werden die basophilen Zellbestandteile durch den Kernfarbstoff Hämatoxilin blau bis hellviolett dargestellt, wobei Eosin die azidophilen Substanzen (z.B. Zytoplasma) in verschiedenen Rottönen anfärbt⁵⁴.

Für die Färbung wurden die Objektträger in Küvetten gestellt und für 90 sec in Mayers Hämalaun getaucht. Es folgte eine Bläuung für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser. Nach kurzem Abspülen mit destilliertem Wasser folgte als zweiter Schritt eine Gegenfärbung mit Eosin für 30 Sekunden. Nach Abspülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt eingedeckelt.

4.2.15. Probenaufbereitung für 3D Micro- und Nano-CT-Bildgebung

Zu entsprechenden Zeiten des Versuchsprotokolls wurden die Tiere transkardiell perfundiert. Dazu wurde zunächst bei den Tieren eine tiefe Inhalationsnarkose eingeleitet (5% Isofluran in 3,0 l/min. Luft), das Tier in Rückenlage positioniert und der Thorax eröffnet. Der linke Herzventrikel wurde punktiert und physiologische Kochsalzlösung eingespült bis der venöse Abfluss, sichtbar durch das eröffnete rechte Herzohr, keine Blutbestandteile mehr zeigte. Nachdem alle Rippen abgesetzt waren, wurden die A. subclavia sinistra und dextra sowie die Aorta auf Höhe des Aortenbogens und an der Herzbasis mit einem 4-0 Faden legiert.

Zunächst wurde das bleihaltige röntgendichte Polymer (Microfil MV-122) aus einer Basis, einem Verdünner und einem Härter in einem Verhältnis von 1:1:0,05 angemischt. 10 ml des Polymers wurden dann über eine Arteriotomie in die A. carotis communis injiziert. Nach einer Aushärtungszeit von ca. 60 min wurde das Gehirn zusammen mit der Dura mater herauspräpariert und in 4,5%ige Formalinlösung überführt.

4.2.16. Bildgebung 3D Micro-CT

Für die Bildgebung wurde das Gehirn aufrecht mit dem Kleinhirn basal auf dem Probenhalter fixiert und im Gerät (SkyScan 1072, 80 kV, Belgien) platziert. Das Röntgensystem basiert auf einer Mikrofokus-Röhre (20-80 kVp, 0-100 μ A), welche eine minimale Punktgröße von 8 μ m bei 8W erreicht¹¹³. Die Röntgenstrahlen werden kegelförmig emittiert, durchlaufen das sich rotierende Objekt und treffen vergrößert auf den Detektor auf¹⁴¹. Die resultierenden Bilder wurden mittels spezieller Software dargestellt (AnalyzeTM 8.0; Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN)¹¹³. Die Rekonstruktion der Volumendaten erfolgte aus den Projektionen und Geometriedaten¹²⁷. Das Micro-CT wurde so konfiguriert, dass die Voxel eine Seitenlänge von 12 μ m aufwiesen.

4.2.17. Bildgebung 3D Nano-CT

Für eine noch detailliertere Aufnahme der Blutgefäße wurde eine "region of interest" aus dem Stromgebiet der Arteria cerebri media mit einer Kantenlänge von 4 mm definiert, herausgeschnitten und mit einem Nano-CT (Nano-CT_2011; SkyScanTM, Kontich, Belgien) wiederholt gescannt.

Die Mikrofokus-Röntgenquelle besteht bei diesem System aus einer offenen Quelle mit einer Lanthanhexaborit-Kathode. Der Elektronenstrahl wird durch zwei magnetische Linsen auf das Target fokussiert.

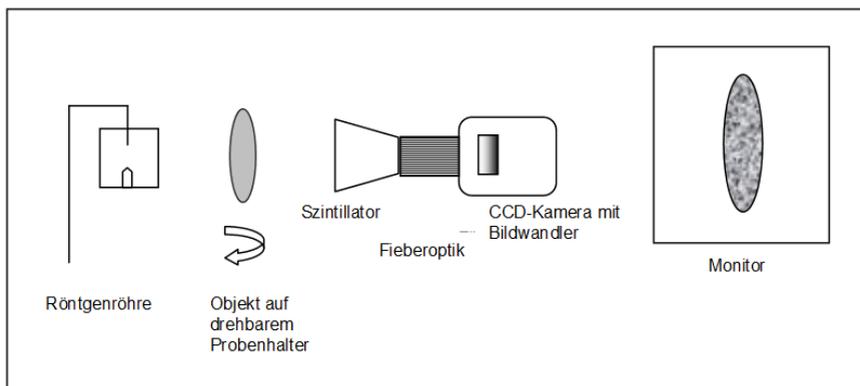


Abb. 17: Schematischer Aufbau des Nano-CT's

Das "target" beinhaltet ein aus einem mit Wolfram beschichtetem Beryllium-Fenster. Es entsteht ein optischer Fokus mit der Größe von $< 400 \mu\text{m}$. Dadurch entsteht eine Auflösung bis zu 150 nm . Der Röntgendetektor besteht aus einer 12-bit digitalen, wassergekühlten CCD-Kamera (1280×1024 Pixel) mit Fieberoptik 3,7:1, die an einen Szintillator und Bildwandler gekoppelt ist (Abb. 17). Für die hiesige Anwendung wurden die Proben auf einen computergesteuerten rotierenden Probenhalter montiert und bei 180° um die vertikale Achse in Rotationsschritten von $0,25^\circ$ bei 40 kVp gescannt. Die Akquisitionszeit lag bei 2,4 Sekunden.

4.3. Studiendesign

Alle der hier beschriebenen Tierversuche erfolgten nach Prüfung und Genehmigung durch die §15-Kommission des Veterinärdezernats des Regierungspräsidiums Darmstadt. Alle Tiere wurden unter Einhaltung der tierschutzrechtlichen Gesichtspunkte des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. Jahrgang 1998 Teil I, Nr.30, S: 1105) ordnungsgemäß behandelt und untergebracht. Die Versuche erfolgten unter Aufsicht des Leiters des Tierversuchsvorhabens, Prof. Dr. Max Nedelmann (Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg) und des Tierschutzbeauftragten und Tierstalleiters Dr. Christian Hartmann (Max-Planck-Institut, Bad Nauheim). Des Weiteren wurden die Leitsätze der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) eingehalten.

4.3.1. Experiment I: 60kHz-Thrombolyse

4.3.1.1. Ziel

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um die unerwünschten Nebenwirkungen des transkraniellen Ultraschalls bei geringer Frequenz und niedriger Intensität auf das ischämische Hirnparenchym zu ermitteln.

4.3.1.2. Versuchsgruppeneinteilung

In dieser Studie wurden die Tiere in 4 Versuchsgruppen mit je 11 Tieren eingeteilt (Tab. 3). In zwei Gruppen wurde die A. cerebri media permanent verschlossen, wobei in den zwei anderen Gruppen eine Reperfusion nach 90 Minuten durchgeführt wurde. Alle Tiere erhielten anschliessend eine Behandlung mit rt-PA. Jeweils eine Gruppe mit permanentem und eine Gruppe mit transientem Verschluss der A. cerebri media erhielt eine zusätzliche Beschallung mit 60 kHz über eine Stunde.

Gruppe I	transienter Verschluss	rt-PA	60 kHz
Gruppe II	transienter Verschluss	rt-PA	
Gruppe III	permanenter Verschluss	rt-PA	60 kHz
Gruppe IV	permanenter Verschluss	rt-PA	

Tab. 3: Versuchsgruppeneinteilung

4.3.1.3. Studienablauf

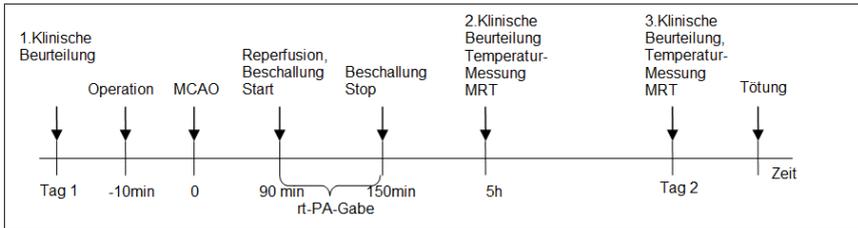


Abb. 18: Schematischer Studienablauf der Gruppen I und II

Zuerst wurden die Tiere klinisch-neurologisch beurteilt und im Anschluss narkotisiert. Nach Erreichen der Operationstoleranz wurde eine rektale Temperatursonde positioniert und ein arterieller Katheter in die A. femoralis gelegt. Nach Entnahme der Blutprobe wurde diese auf die Parameter O₂-Partialdruck, CO₂-Partialdruck und pH untersucht. Anschließend erfolgte die Bestimmung des mittleren arteriellen Blutdrucks. Bei allen Tieren wurde mittels Fadentechnik ein Infarkt induziert. Bei den Tieren in den Gruppen I und II wurde nach 90 Minuten eine Reperfusion durchgeführt (Abb. 18). Die Gruppen III und IV wurden einer Sham-Prozedur unterzogen. Dafür wurden die Tiere für die Reperfusion vorbereitet, allerdings der Faden im Gefäß belassen. Direkt im Anschluss wurden die Tiere, wie unter Punkt 4.2.4. beschrieben, für die Beschallung präpariert. Alle Tiere erhielten rt-PA (10 mg/kg, 10% als Bolus,

der Rest als Infusion über 1h). Die Tiere in den Gruppen I und III wurden während dieser Stunde mit 60 kHz beschallt. Die anderen beiden Gruppen wurden gleich präpariert und positioniert, allerdings wurde das Ultraschallgerät während der ein-stündigen rt-PA-Behandlung nicht in Betrieb genommen.

Fünf Stunden nach dem Verschluss der A. cerebri media wurden die Tiere einer zweiten neurologische Untersuchung unterzogen und eine MRT-Untersuchung durchgeführt.

Vierundzwanzig Stunden nach Infarktinduktion wurden die Tiere erneut neurologisch getestet und im Anschluss einer MRT-Untersuchung unterzogen. Unmittelbar nach der MRT-Bildgebung wurden die Tiere getötet und das Gehirn für die histologische Untersuchung aufbereitet.

Die neurologische Untersuchung und die computergestützte planimetrische Ermittlung der Infarkt volumina erfolgten durch einen, für die Randomisierung und klinische Befunde geblindeten, erfahrenen Untersucher.

4.3.1.4. Bestimmung der Infarktgrößen, des ADC und der T2-Relaxationszeit

Die Infarkt volumina wurden anhand der MRT-Bildgebung bestimmt.

Auf den T2-gewichteten Bildgebungen stellten die hellen, echoreichen Gebiete die Infarkt areale dar. Unter Verwendung einer Bildanalyse-Software (Image J 1,38 x; National Institutes of Health, USA) wurden die Größen der beiden Hemisphären und des gesamten Infarktgebietes für jede koronare Schicht gemessen. Der prozentuale Anteil des Läsionsvolumens (%HLV) wurde berechnet und für den raumfordernden Effekt des Hirnödems unter Verwendung der u.a. Formel korrigiert:

$$\%HLV_e = ((HVC - HVi + LV) / HVC) \cdot 100,$$

wobei LV das direkte Läsionsvolumen, HVi das ipsilaterale Hemisphärenvolumen und HVC das kontralaterale Hemisphärenvolumen darstellt. Beide Volumina wurden durch eine Multiplikation aller Schichten mit 2 mm (Schichtdicke) und einer anschließenden Addition errechnet⁵⁶.

ADC und T2-Relaxationszeit wurden in regions of interest (ROI) unter Verwendung der Bildverarbeitungssoftware ermittelt. Die Positionierung der ROI wurde auf den

erstellten ADC-maps festgelegt. Auf jeder Schicht, auf der eine ischämische Läsion aufzufinden war, wurde eine ROI im Zentrum des kortikalen und subkortikalen Anteils der Läsion platziert, sowie im Bereich des Nervus trigeminus. Im Anschluss wurden die ROIs jeweils auf der kontralateralen Hemisphäre an korrespondierender Stelle positioniert. Schichten ohne ischämische Läsion wurden nicht berücksichtigt. Die Mittelwerte der ADC-Werte aller kortikalen, subkortikalen und N. trigeminus ROIs wurden für beide Hemisphären ermittelt. Die Quantifizierung der T2-Relaxationszeit wurde unter Verwendung der gleichen ROI-Positionen wie bei der ADC-Quantifizierung vorgenommen.

Die Quantifizierung wurde bei den MRT-Untersuchungen, die nach 5 und 24 Stunden ermittelt wurden, durchgeführt.

4.3.1.5. Ausschlusskriterien

Vor dem Beginn der Experimente wurden folgende Ausschlusskriterien definiert:

Fehlen eines Infarktes im Versorgungsgebiet der A. cerebri media auf der T2-gewichteten Bildgebung

Vorliegen einer subarachnoidalen oder intrazerebralen Blutung bei der postmortalen Inspektion

Alle ausgeschlossenen Tiere wurden ersetzt.

4.3.1.6. Datenanalyse und statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden folgende Testverfahren herangezogen und mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS® 12.0 for Windows (SPSS Incorporation, Chicago, USA) ausgewertet:

Der χ^2 -Test wurde für die Evaluation der Todesrate und des verminderten Hörvermögens verwendet. Der Vergleich der Läsionsvolumina und die Unterschiede im neurologischen Status zwischen beschallten und Placebotieren wurde anhand des Student's t Test und des Mann-Whitney-U-Test vorgenommen.

Die ROI-Daten, ermittelt aus den ADC- und T2-gewichteten MRT-Sequenzen, wurden mit einer Varianzanalyse (ANOVA=Analysis of Variance) für wiederholte Messungen, gefolgt von einer post-hoc-Analyse (Tukey-Kramer Methode) ausgewertet.

Die Daten werden als Mittelwert +/-Standardabweichung dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0.05$ festgelegt.

4.3.2. Experiment II: 3MHz-Thrombolyse

4.3.2.1. Ziel

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um den Einfluss von einer transkraniellen Farb-Doppler-Ultraschallbehandlung kombiniert mit einem Echosignalverstärker und rt-PA auf ischämisches Hirngewebe zu evaluieren.

4.3.2.2. Versuchsgruppeneinteilung

Gruppe I	transienter Verschluss	rt-PA SonoVue®	3 MHz
Gruppe II	transienter Verschluss	rt-PA NaCl	

Tab. 4: Versuchsgruppeneinteilung

In dieser Studie wurden 50 Ratten auf 2 Gruppen aufgeteilt. In beiden Gruppen wurde bei den Tieren die A. cerebri media transient verschlossen. Gruppe I erhielt nach erfolgter Reperfusion eine rt-PA- und SonoVue®-Behandlung, die mit einer 65-minütigen Beschallung von 3 MHz kombiniert wurde. Tiere der Gruppe II erhielten nur rt-PA (Tab. 4) und anstelle von SonoVue® 0,9%ige Kochsalzlösung während der 65-minütigen Sham-Prozedur ohne Beschallung.

4.3.2.3. Studienablauf

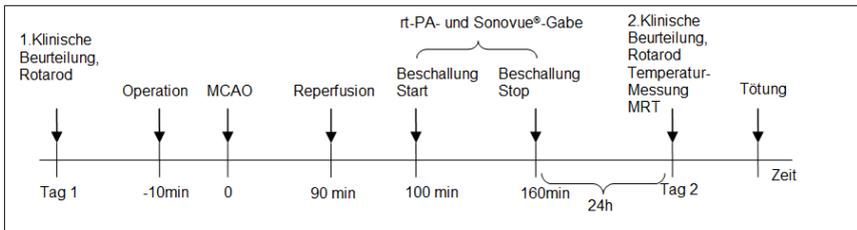


Abb. 19: Studienaufbau am Beispiel der Gruppe I

Zuerst wurden die Tiere klinisch-neurologisch untersucht und im Anschluss, wie zuvor beschrieben, narkotisiert. Nach Erreichen der Operationstoleranz wurde eine rektale Temperatursonde positioniert und ein Katheter in die A. femoralis gelegt. Nach Entnahme der Blutprobe wurde diese auf die Parameter O₂-Partialdruck, CO₂-Partialdruck und pH untersucht. Anschließend erfolgte die Bestimmung des mittleren arteriellen Blutdrucks. Den Tieren wurde mittels Fadentechnik ein Infarkt induziert und nach 90 Minuten eine Reperfusion durchgeführt. Direkt im Anschluss wurden die Tiere, wie unter Punkt 4.2.6 aufgeführt, für die Beschallung präpariert. Alle Tiere erhielten eine rt-PA Behandlung (10 mg/kg, 10% als Bolus, der Rest als Infusion über 1h). Die Tiere in der Gruppe I wurden während der Beschallung zusätzlich mit SonoVue® behandelt (Abb. 19). Die Tiere der Gruppe II wurden in gleicher Weise präpariert und positioniert, allerdings wurde das Ultraschallgerät während der einstündigen rt-PA-Behandlung nicht eingeschaltet. Zu den Zeitpunkten 0, 20, 40 und 60 Minuten erhielten die Tiere die entsprechende Menge an physiologischer Kochsalzlösung anstelle von SonoVue®.

Nach 24 Stunden erfolgte eine zweite neurologische Untersuchung, die Bestimmung der Körpertemperatur sowie eine MRT-Untersuchung. Im Anschluss wurden die Tiere getötet und das Gehirn für die histologische Untersuchung aufbereitet.

Die neurologische Untersuchung und die computergestützte planimetrische Ermittlung der Infarkt volumina erfolgten durch einen, für die Randomisierung und klinische Befunde geblindeten, erfahrenen Untersucher.

4.3.2.4. Bestimmung der Infarktgrößen, des ADC und der T2-Relaxationszeit

Die Infarkt volumina wurden anhand der MRT-Bildgebung ermittelt.

Die hellen, echoreichen Gebiete auf den T2-gewichteten Bildern stellten die Infarkt areale dar. Unter Verwendung einer Bildanalyse-Software (Image J 1,38 x; National Institutes of Health, USA) wurden die Größen der beiden Hemisphären und des gesamten Infarktgebietes für jede koronare Schicht gemessen. Der prozentuale Anteil des Läsionsvolumens (%HLV) wurde errechnet und für den raumfordernden Effekt des Hirnödems unter Verwendung der dargestellten Formel korrigiert:

$$\%HLV_e = ((HVC - HVi + LV) / HVC) \cdot 100,$$

LV stellt das direkte Läsionsvolumen, HVi das ipsilaterale Hemisphärenvolumen und HVC das kontralaterale Hemisphärenvolumen dar. Die Volumina wurden durch eine Multiplikation aller Schichten mit 2 mm (Schichtdicke) und einer anschließenden Addition berechnet⁵⁶.

ADC und T2-Relaxationszeit wurden in regions of interest (ROI) unter Verwendung der Bildverarbeitungssoftware ermittelt. Die Positionierung der ROI wurde auf den erstellten ADC-maps festgelegt. Auf jeder Schicht, die eine ischämische Läsion nachwies, wurde eine ROI im Zentrum des kortikalen und subkortikalen Anteils der Läsion platziert. Anschliessend wurden ROI jeweils auf der kontralateralen Hemisphäre an korrespondierenden Positionen platziert. Schichten ohne ischämische Läsion wurden nicht berücksichtigt. Die Mittelwerte der ADC-Werte aller kortikalen und subkortikalen ROI wurden für beide Hemisphären ermittelt. Die Quantifizierung der T2-Relaxationszeit wurde unter Verwendung der gleichen ROI-Positionen wie bei der ADC-Quantifizierung durchgeführt.

4.3.2.5. Ausschlusskriterien

Vor dem Beginn der Experimente wurden folgende Ausschlusskriterien festgelegt:

Fehlender Nachweis eines Infarktes im Versorgungsgebiet der A. cerebri media auf der T2- Sequenz

Nachweis von Blutungskomplikationen in der T2*-Bildgebung oder bei der postmortalen Inspektion

Alle ausgeschlossenen Tiere wurden ersetzt.

4.3.2.6. Datenanalyse und statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden folgende Testverfahren herangezogen und mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS® 15.0 for Windows (SPSS Incorporation, Chicago, USA) ausgewertet:

Der Vergleich der Infarkt volumina, Ödembildung und der neurologische Status zwischen den beiden Gruppen wurde anhand eines zweiseitigen Student's t-test und eines Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Die Daten werden als Mittelwert +/-Standardabweichung dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0.05$ festgelegt.

4.3.3. Experiment III: Zerebrale Temperaturentwicklung während 60 kHz-Beschallung

4.3.3.1. Ziel

Ultraschall extrem niedriger Frequenz und hoher Energie (z.B. 20 KHz; 8-23 W) kann zu ausgeprägten thermischen Effekten führen^{8, 76}.

Der Einfluss der intermittierenden Beschallung auf die Temperaturentwicklung im Gehirn sollte mit diesem Versuchsaufbau bestimmt werden.

4.3.3.2. Versuchsgruppeneinteilung

Gruppe I	transienter Verschluss	Intermittierender Ultraschall	60 kHz
Gruppe II	transienter Verschluss	Permanenter Ultraschall	60 kHz

Tab. 5: Versuchsgruppeneinteilung

Sechs zusätzliche Tiere wurden gemäß Protokoll operiert. Nach erfolgter Reperfusion wurde den Tieren wie zuvor beschrieben eine zerebrale Temperatursonde implantiert. Es erfolgte Randomisierung in 2 Gruppen (Tab. 5). Gruppe I wurde mit den unter Punkt 4.2.5 angegebenen Parametern beschallt, während Gruppe II eine durchgehende Beschallung über 1 Stunde erhielt. Gleichzeitig wurde zu festgelegten Zeitpunkten die zerebrale Temperatur protokolliert.

4.3.3.3. Studienablauf

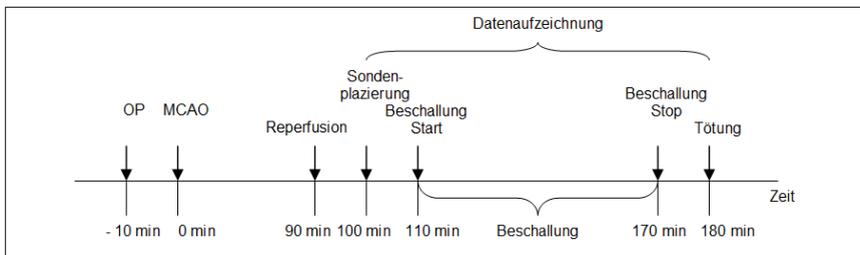


Abb.20: schematische Darstellung des Studienablaufs

Die narkotisierten Tiere erhielten einen Verschluss der A. cerebri media mittels Fadentechnik. Nach 90 Minuten erfolgte die Reperfusion. Anschliessend wurde die Schädelhaut für die Beschallung präpariert. Zusätzlich wurde eine kranielle Temperatursonde, über eine vorgenommene Bohrung, im Gehirnparenchym des

Versorgungsgebietes der A. cerebri media platziert. Den Tieren wurde ebenfalls eine rektale Temperatursonde gelegt. Alle fünf Minuten wurden die Temperaturwerte notiert. Nach zehn Minuten wurde der Ultraschall mit der gewählten Modalität (intermittierend/permanent) eingeschaltet. Es erfolgte eine 60 minütige Beschallung. Nach weiteren 10 Minuten wurden die Versuche beendet und die Tiere getötet (Abb. 20).

4.3.3.4. Ausschlusskriterien

Vor dem Versuch wurde folgendes Ausschlusskriterium festgelegt:

Fehlende Hemiparese links vor der Reperfusion

4.3.3.5. Datenanalyse und statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden folgende Testverfahren herangezogen und mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS® 12.0 for Windows (SPSS Incorporation, Chicago, USA) ausgewertet:

Es wurde die durchschnittliche Differenz zum Ausgangswert berechnet. Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen wurde anhand eines zweiseitigen Student's t-test durchgeführt.

Die Daten werden als Mittelwert +/-Standardabweichung dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0.05$ festgelegt.

4.3.4. Experiment IV: Zerebrale Temperaturentwicklung während 3 MHz-Beschallung

4.3.4.1. Ziel

Der Einfluss der unter Punkt 4.2.7 beschriebenen Einstellungen des diagnostischen Ultraschalls bei erhöhter Expositionszeit auf die intrakranielle Temperaturentwicklung, wurde in diesem Experiment evaluiert.

4.3.4.2. Versuchsgruppeneinteilung

Gruppe I	transienter Verschluss	3MHz
----------	------------------------	------

Tab. 6: Gruppeneinteilung

Drei Tiere wurden zusätzlich operiert und erhielten einen transienten Verschluss. Nach Platzierung einer Temperatursonde wurden sie gemäß Protokoll beschallt.

4.3.4.3. Studienablauf

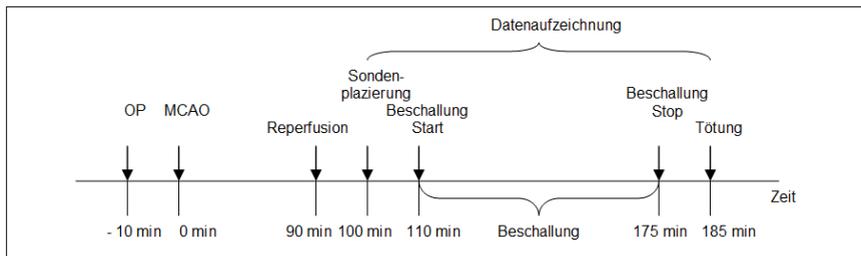


Abb. 21: Studienablauf

An narkotisierten Tieren wurde ein transienter Verschluss der A. cerebri media mittels Fadentechnik durchgeführt. Nach 90 Minuten erfolgte die Reperfusion. Anschliessend wurde die Schädelhaut für die Beschallung präpariert. Zusätzlich wurde eine kranielle Temperatursonde, über eine vorgenommene Bohrung, im Gehirnparenchym des Versorgungsgebietes der A. cerebri media platziert. Den Tieren wurde ebenfalls eine rektale Temperatursonde gelegt. Nach einer 10-minütigen Adaptationsphase wurde der Ultraschall eingeschaltet und es erfolgte eine 65-minütige Beschallung. Alle fünf Minuten wurden die Temperaturwerte protokolliert. 10 Minuten nach Beenden der Ultraschallbehandlung wurden die Versuche abgebrochen und die Tiere getötet (Abb. 21).

4.3.4.4. Ausschlusskriterien

Vor dem Versuch wurde folgendes Ausschlusskriterium festgelegt:

Fehlende Hemiparese links vor der Reperfusion

4.3.4.5. Datenanalyse und statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden folgende Testverfahren herangezogen und mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS® 15.0 for Windows (SPSS Incorporation, Chicago, USA) ausgewertet:

Es wurde die durchschnittliche Differenz zum Ausgangswert berechnet. Die Daten werden als Mittelwert +/-Standardabweichung dargestellt.

4.3.5. Experiment V: Postmortale 3D Micro- und Nano-CT-Bildgebung nach 3 MHz-Beschallung

4.3.5.1. Ziel

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um eine quantitative Bewertung der microvaskulären Perfusion der zerebralen Gefäße nach einer Behandlung mit 3 MHz-Ultraschall in Kombination mit SonoVue® und rt-PA zu bestimmen. Verglichen wurden die Effekte mit einer Monotherapie mit intravenösem rt-PA und mit der Situation ohne Behandlung.

4.3.5.2. Versuchsgruppeneinteilung

In dieser Studie wurden die Tiere in 4 Versuchsgruppen mit je 3 Tieren eingeteilt (Tab. 7). Alle Tiere erhielten eine transiente Faden-Operation. Eine Gruppe wurde direkt nach der Reperfusion dem Fixationsprozeß unterzogen, eine weitere 60 Minuten nach der Reperfusion. Die beiden weiteren Gruppen wurden mit dem unter Experiment 2 beschriebenen Protokoll behandelt und im Anschluss fixiert.

Gruppe I	transienter Verschluss		direkt nach Reperfusion
Gruppe II	transienter Verschluss		1h nach Reperfusion
Gruppe III	transienter Verschluss	rt-PA	1h nach Reperfusion
Gruppe IV	transienter Verschluss	rt-PA Sonovue 3 MHz	1h nach Reperfusion

Tab. 7: Versuchsgruppeneinteilung

4.3.5.3. Studienablauf

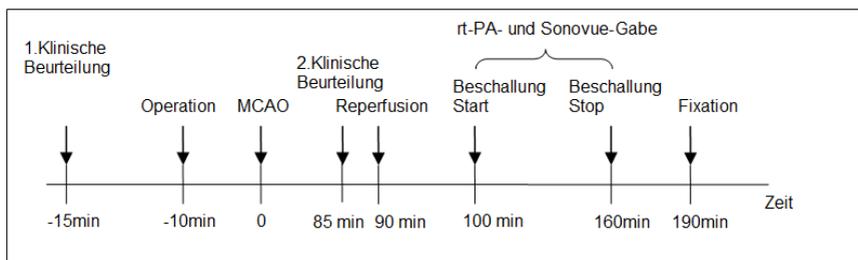


Abb. 22.: Studienablauf am Beispiel der Gruppe IV

Vor der Narkoseeinleitung wurden die Tiere einer neurologischen Untersuchung unterzogen. An den narkotisierten Tieren wurde ein transienter Verschluss der A. cerebri media mittels Fadentechnik durchgeführt. Im Anschluss an eine nochmalige neurologischer Testung 85 Minuten nach Schlaganfallinduktion wurden die Tiere für die Reperfusion nach 90 Minuten anästhesiert. Die Tiere der Gruppe I wurden direkt nach der Reperfusion fixiert, während die Tiere der Gruppe II erst nach weiteren 60 Minuten dem Fixationsprozeß, wie unter Punkt 4.2.14. beschrieben, unterzogen wurden. Mit den Gruppen III und IV wurde nach den unter Punkt 4.3.2.3. beschriebenen Protokollen verfahren. Gruppe III wurde einer Shambehandlung unterzogen, wohingegen die Tiere der Gruppe IV einer Ultraschallbehandlung mit

3MHz einschließlich rt-Pa- und SonoVue®-Applikation behandelt wurden (Abb. 22). Im Anschluss wurden diese Tiere ebenfalls fixiert. Die präparierten Gehirne wurden der Micro- und Nano-CT-Bildgebung zugeführt.

4.3.5.4. Einschlusskriterien

Da auf eine begleitende Bildgebung in vivo verzichtet wurde, mussten alle Versuchstiere vor der Reperfusion eine deutliche Hemiparese zeigen. Dies diente als Positivzeichen eines vorhandenen Infarktes.

4.3.5.5. Datenanalyse und statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit JMP 6.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt. Der vaskuläre Volumenanteil wurde mittels eines einseitigen t-Tests und einseitiger ANOVA bestimmt. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant festgelegt.

V. Ergebnisse

1. Experiment I: 60 kHz-Thrombolyse

1.1. Gruppenbesetzung

Gruppe I	transienter Verschluss	rt-PA	60 kHz	12 Tiere
Gruppe II	transienter Verschluss	rt-PA		10 Tiere
Gruppe III	permanenter Verschluss	rt-PA	60 kHz	11 Tiere
Gruppe IV	permanenter Verschluss	rt-PA		11 Tiere

Tab. 8: Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen bei der 60 kHz-Thrombolyse

1.2. Physiologische Befunde

Bei dem Vergleich der physiologischen Parameter konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen festgestellt werden.

1.3. Mortalitätsrate

Für diese Studie wurden insgesamt 45 männliche Wistar-Unilever-Ratten operiert. Ein Tier verstarb während der MCAO-Operation und wurde ausgeschlossen. Während der gesamten Versuchsdauer verstarben insgesamt 16 Tiere.

Gruppe I	transienter Verschluss	rt-PA	60 kHz	4 Tiere
Gruppe II	transienter Verschluss	rt-PA		2 Tiere
Gruppe III	permanenter Verschluss	rt-PA	60 kHz	6 Tiere
Gruppe IV	permanenter Verschluss	rt-PA		4 Tiere

Tab. 9: Anzahl der verstorbenen Tiere in den einzelnen Gruppen der 60 kHz-Thrombolyse

Die Gesamt-Mortalitätsrate war nicht signifikant höher in den Gruppen der beschallten Tiere im Vergleich zu den Gruppen der unbeschallten Tiere (Abb. 23).

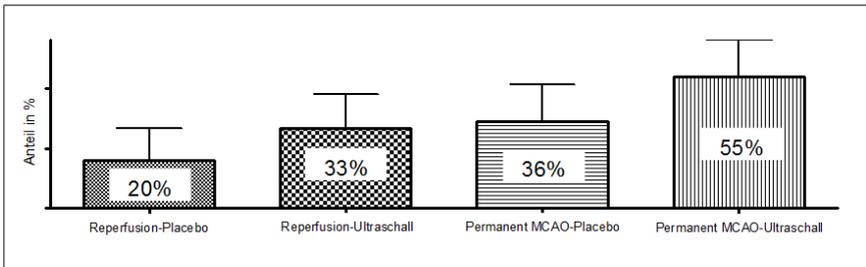


Abb. 23: Prozentualer Anteil der verstorbenen Tiere in den einzelnen Gruppen

Eine genaue Betrachtung des Todeszeitpunktes zeigte, dass 25% der beschallten Tiere, die einer Reperfusion unterzogen wurde, und 36% der Tiere, die eine permanente Okklusion der A. cerebri media aufwiesen, während der Ultraschallbehandlung verstarben (Abb. 24). Bei dem jeweiligem Vergleich zu der Kontrollgruppe, von denen kein Tier während der 1-stündigen Sham-Prozedur verstarb, zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei den permanenten Ischämien ($p < 0.05$).

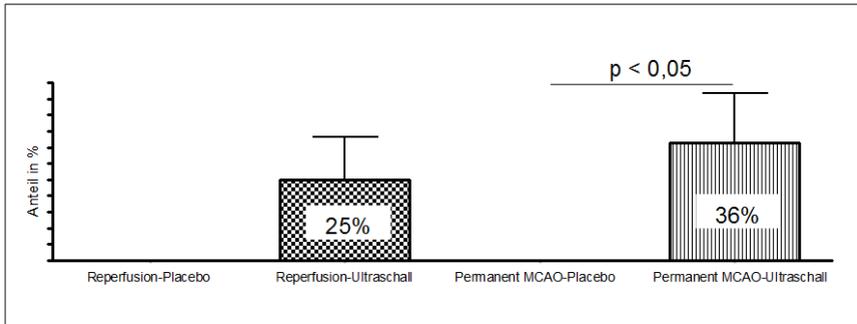


Abb. 24: Prozentualer Anteil der verstorbenen Tiere in den einzelnen Gruppen, bezogen auf den Todeszeitpunkt

1.4. Post-mortem Befunde

Postmortal konnten mittels Histologie bei den beschallten Tieren mit transientem und permanentem Verschluss zum einen intrazerebrale Mikroblutungen, die nicht auf das Läsionsareal beschränkt waren, sowie subarachnoidale Blutungen festgestellt werden (Abb. 25). Die subarachnoidalen Blutungen traten verstärkt zwischen den Hemisphären und dem umliegenden Gewebe auf.

Eine leichte hämorrhagische Transformation innerhalb des Läsionsareals wurde sowohl bei einem beschallten, als auch bei einem sham-behandelten Tier (Tab.9), die beide einem permanentem Verschluss der A. cerebri media unterzogen wurden, festgestellt.

Histologisch konnten keine pathologischen Befunde im Bereich der Temporallappen oder im Hirnstamm festgestellt werden.

Gruppe I	transienter Verschluss	rt-PA	60 kHz	1 x intrazerebrale Blutung 2 x Subarachnoidale Blutung
Gruppe II	transienter Verschluss	rt-PA		
Gruppe III	permanenter Verschluss	rt-PA	60 kHz	1 x intrazerebrale Blutung 2 x subarachnoidale Blutung 1 x hämorrhagische Transformation
Gruppe IV	permanenter Verschluss	rt-PA		1 x hämorrhagische Transformation

Tab. 9: Anzahl und Art der histologischen Veränderungen in den einzelnen Gruppen

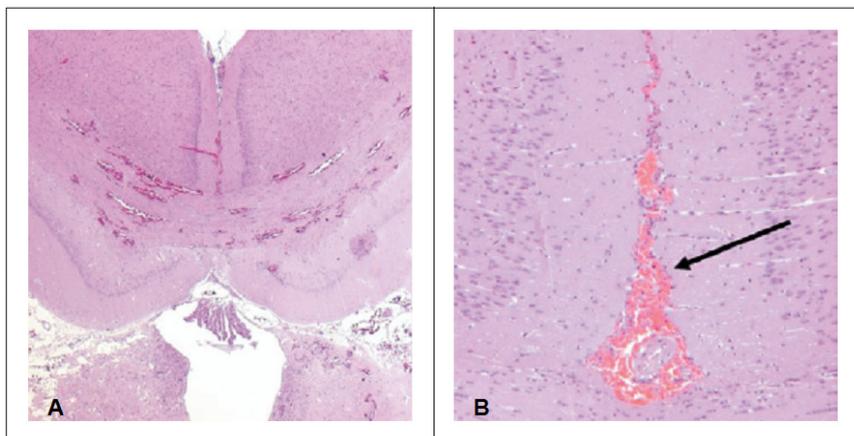


Abb. 25: Darstellung einer disseminierten intrazerebralen Mikroblutung (A) und einer subarachnoidalen Blutung (B, Pfeil), jeweils in einem HE-Präparat¹².

1.5. MRT Befunde

1.5.1. Läsionsvolumen

Die Berechnung des ödemkorrigierten Läsionsvolumens anhand der T2-gewichteten MRT-Bilder und ein Vergleich zwischen den beschallten und den Sham-Tieren zeigte einen Unterschied zwischen den Gruppen mit transientem und permanentem Verschluss. Die Tiere mit transientem Verschluss der A. cerebri media und

Ultraschallbehandlung zeigten sowohl nach 5 (Abb. 26) (Ultraschall: 10,4%±8,7 vs. Placebo: 3,0%±2,8) sowie nach 24 Stunden (Abb. 27) (Ultraschall: 20,3%±13,0 vs. Placebo: 8,6%±5,1) signifikant größere Läsionsvolumen im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Bei den Tieren mit permanentem Verschluss war nach 5 (Ultraschall: 17,5%±12,8 vs. Placebo: 13,8%±7,4) und 24 Stunden (Ultraschall: 37,8%±14,6 vs. Placebo: 34,5%±12,6) kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen detektierbar ($p > 0,05$).

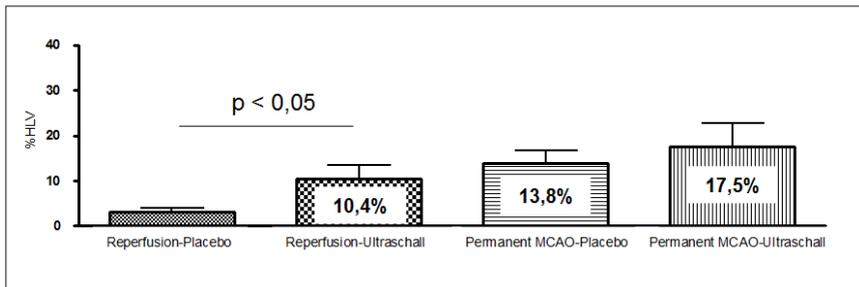


Abb. 26: Darstellung des ödemkorrigierten Läsionsvolumens nach 5 Stunden in den einzelnen Gruppen

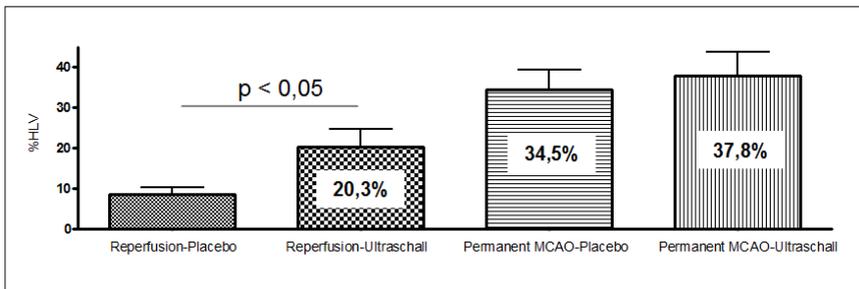


Abb. 27: Darstellung des ödemkorrigierten Läsionsvolumens nach 24 Stunden in den einzelnen Gruppen

1.5.2. ADC und T2-Relaxationszeit

Die Ermittlung des ADC (Abb. 28) und der T2-Relaxationszeit (Abb. 29) in den festgelegten kortikalen und subkortikalen Arealen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

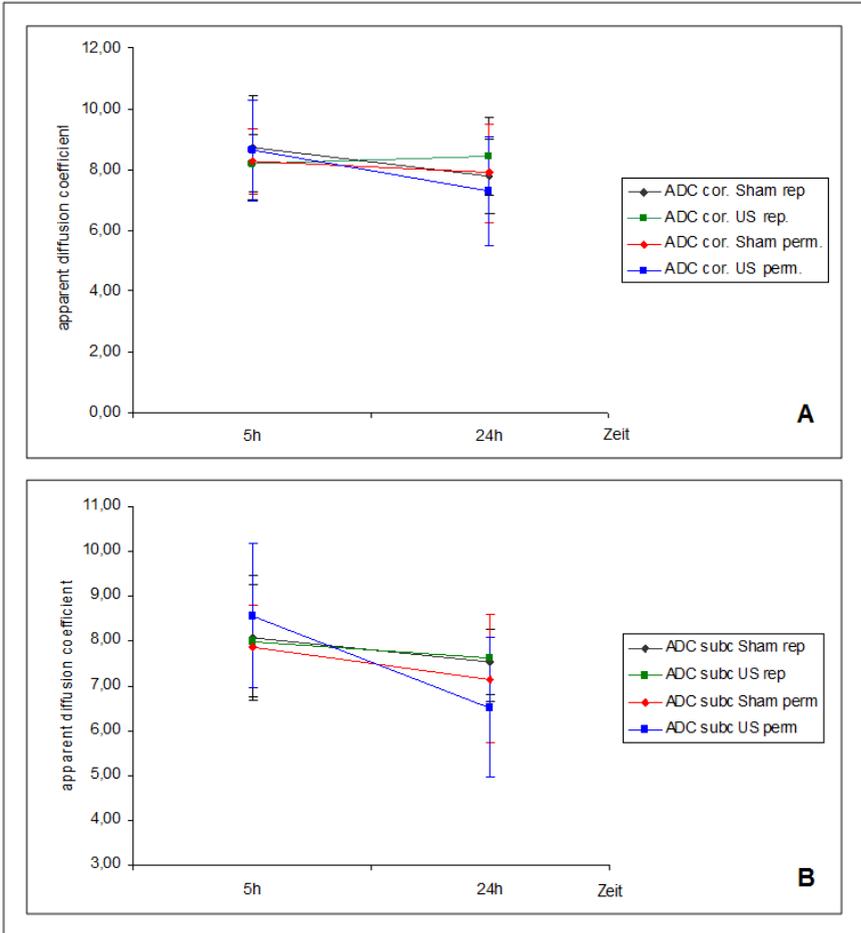


Abb. 28: Graphische Darstellung des kortikalen (A) und subkortikalen ADC (B) jeweils 5 und 24 Stunden nach Infarktinduktion.

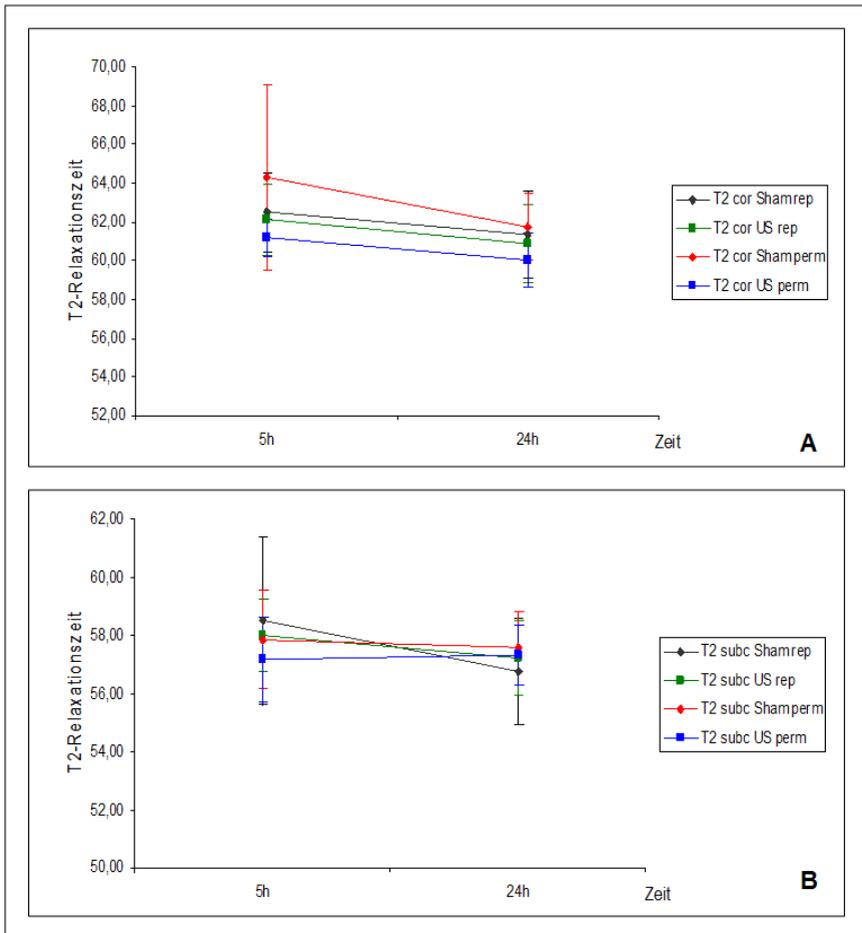


Abb. 29: Graphische Darstellung der kortikalen (A) und subkortikalen (B) T2-Relaxationszeit jeweils 5 und 24 Stunden nach Infarktinduktion.

Die Ermittlung der ADC- und T2-Werte im Bereich des Nervus trigeminus zeigte keine signifikanten Unterschiede bei den gewählten MRT-Zeitpunkten (Abb. 30).

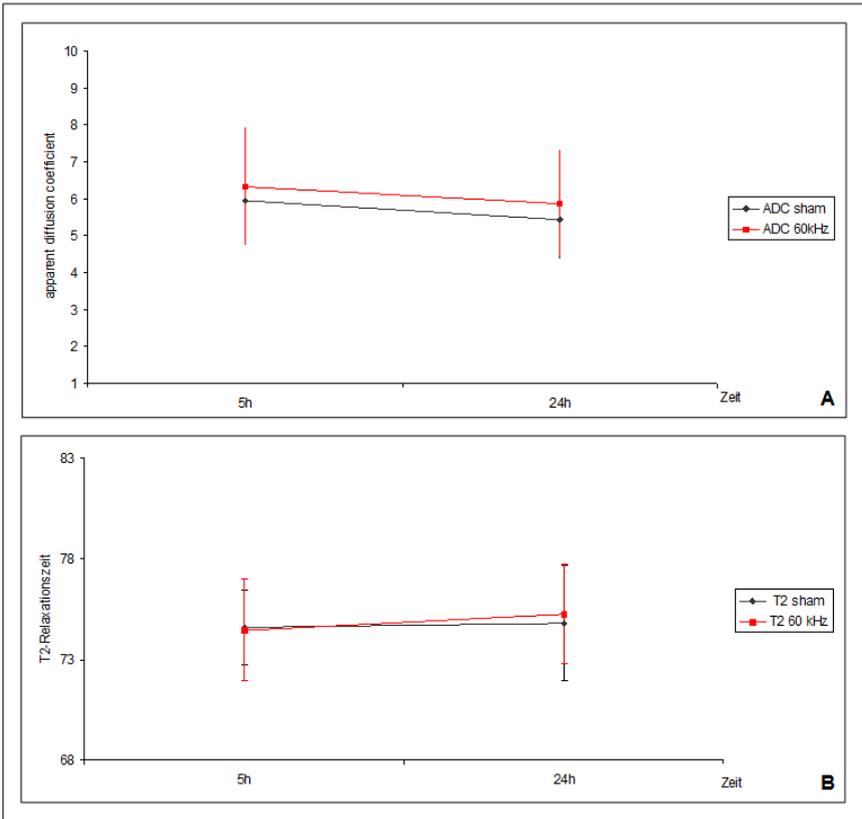


Abb. 30: Graphische Darstellung des ADC (A) und der T2-Relaxationszeit (B) jeweils 5 und 24 Stunden nach Infarktinduktion im Bereich des N. trigeminus.

1.6. Neurologische Befunde

Die maximal erreichbare Punktzahl im Neuroscore lag bei 90 und die geringste bei 0 Punkten, wenn keinerlei Beeinträchtigung vorlag. Die Tiere mit Ultraschallbehandlung zeigten eine höhere Punktzahl als die Tiere, die einer Sham-Prozedur unterzogen wurden (Tab. 10, Abb. 31).

				Neuroscore 5 h	Neuroscore 24 h
Gruppe I	transienter Verschluss	rt-PA	60 kHz	33,1 ± 7,9	36,1 ± 14,1
Gruppe II	transienter Verschluss	rt-PA		28,8 ± 11,6	25,0 ± 14,4
Gruppe III	permanenter Verschluss	rt-PA	60 kHz	41,7 ± 12,1	52,5 ± 9,4
Gruppe IV	permanenter Verschluss	rt-PA		32,9 ± 7,6	37,1 ± 6,4

Tab. 10: Neuroscores der einzelnen Gruppen nach 5 und 24 Stunden, dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung

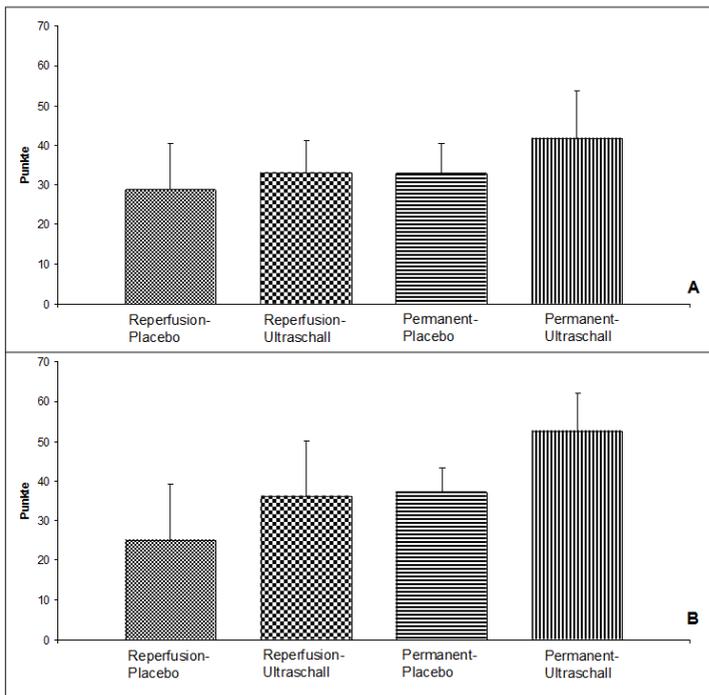


Abb. 31: Graphische Darstellung des Neuroscores der Gruppen nach 5 Stunden (A) und nach 24 Stunden (B)

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Tests, wurde festgestellt, dass die Beurteilung des Hörvermögens die Neuroscore-Differenz zwischen den mit Ultraschall behandelten Tieren und den Kontrolltieren verursacht (Abb. 32). Eine Beeinträchtigung des Hörvermögens konnte nur in den Gruppen beobachtet werden, in denen eine Ultraschallbehandlung durchgeführt wurde. Bei einem Drittel der Tiere mit transientem Verschluss und bei allen Tieren mit permanentem Verschluss war das Hörvermögen geschädigt.

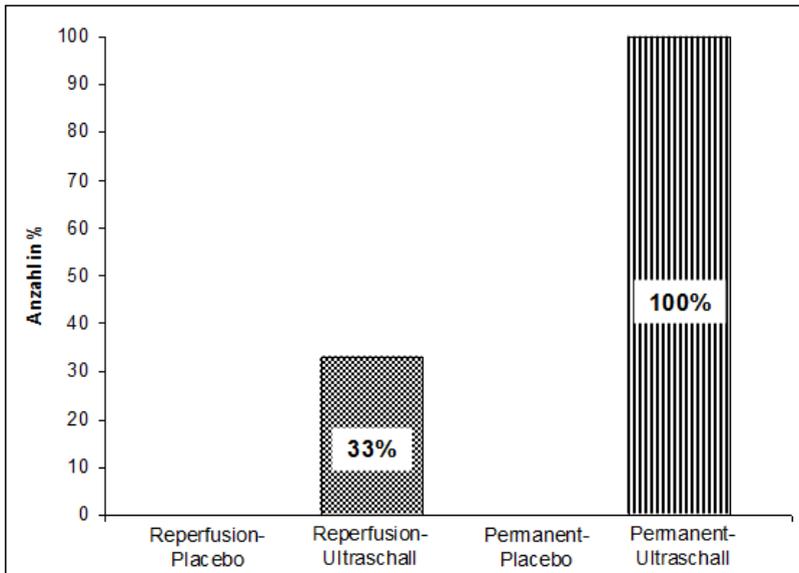


Abb. 32: Graphische Darstellung der Anzahl der Tiere mit beeinträchtigtem Hörvermögen in den einzelnen Gruppen.

2. Experiment II: 3 MHz-Thrombolyse

2.1. Gruppenbesetzung

Gruppe I	transienter Verschluss	rt-PA Sonovue	3 MHz	25 Tiere
Gruppe II	transienter Verschluss	rt-PA NaCl		25 Tiere

Tab. 11: Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen bei der 3 MHz-Thrombolyse

2.2. Physiologische Befunde

Bei dem Vergleich der physiologischen Parameter konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen festgestellt werden.

2.3. Mortalitätsrate

Für diese Studie wurden 51 männliche Wistar-Unilever-Ratten operiert. Ein Tier verstarb während der MCAO-Operation wegen einer provozierten subarachnoidalen Blutung und wurde ersetzt. Alle eingeschlossenen Tiere überlebten die gesamte Versuchsdauer.

2.4. Post-Mortem-Befunde

In der mit Ultraschall, rt-PA und Sonovue[®] behandelten Gruppe, wurde bei einem Tier eine Blutung (Abb. 33B) nahe des Ventrikels in der Histologie festgestellt.

Bis auf modellbedingte ischämische Veränderungen (Abb. 33A), waren in der Sham-Gruppe keine weiteren pathologischen Veränderungen feststellbar.

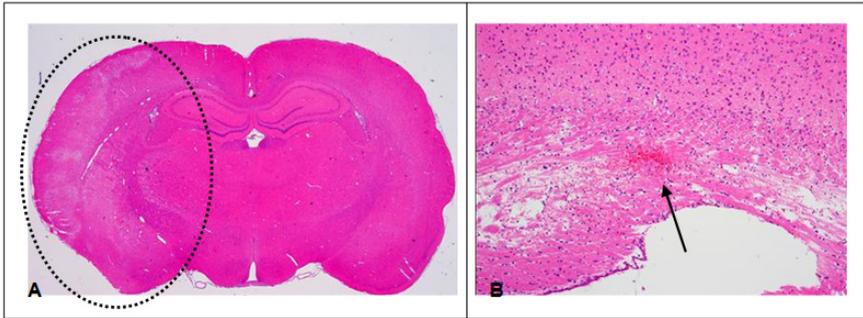


Abb. 33: HE-Schnitt A) mit erkennbaren ischämischen Veränderungen (gestrichelter Kreis) und B) detektierte Blutung (Pfeil)

2.5. MRT-Befunde

2.5.1. Läsionsvolumen

Nach 24 Stunden zeigten die Tiere aus der Gruppe mit Ultraschall- und SonoVue®-Behandlung signifikant kleinere Infarktvolumina. Dies zeigte sich sowohl bei der Auswertung der T2-gewichteten Bilder (Abb. 34A) (Ultraschall+SonoVue®: $22,0\% \pm 11,5$ vs. Sham: $29,5\% \pm 11,8$), wie auch bei der Auswertung der diffusionsgewichteten Bilder (Abb. 34B) (Ultraschall+SonoVue®: $24,1\% \pm 9,5$ vs. Sham: $30,6\% \pm 11,6$).

2.5.2. ADC und T2-Relaxationszeit

Die Mittelwerte der T2-Relaxationszeiten, die in ROIs bestimmt wurde, zeigte im Vergleich der ipsilateralen mit der kontralateralen Hemisphäre einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen nach 24 Stunden. Die Tiere, die eine kombinierte Behandlung mit Ultraschall und Echosignalverstärker erhielten, zeigten signifikant geringere T2-Relaxationszeiten als die Kontrollgruppe ($22,2 \pm 9,9$ vs. $26,1 \pm 7,4$).

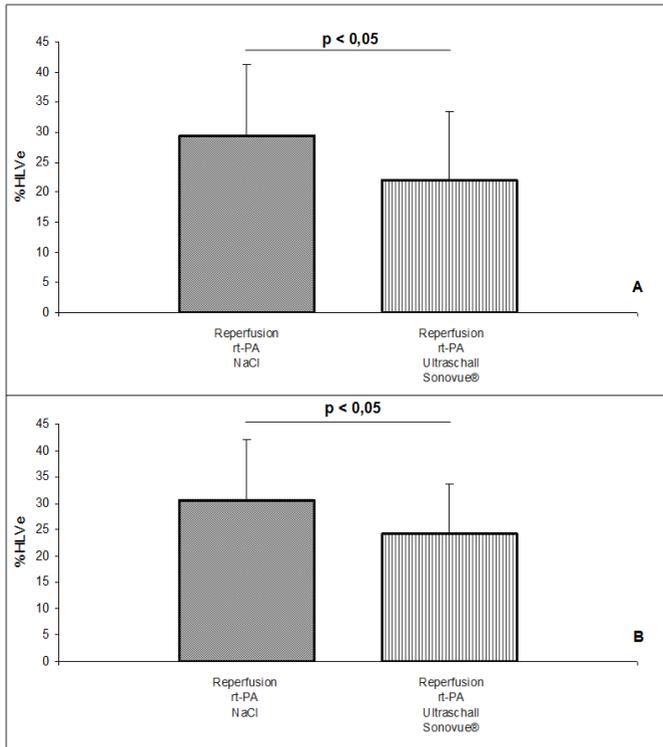


Abb. 34: Graphische Darstellung des prozentualen ödemkorrigierten Läsionsvolumens anhand der T2-ermittelten (A) und ADC-ermittelten (B)-Werte

2.6. Neurologische Befunde

2.6.1. Neuroscore

Die Ermittlung des Neuroscores nach 24 Stunden (Abb. 35) zeigte einen nicht signifikanten Trend zu einem besseren neurologischen Status in der Gruppe der Tiere mit Ultraschallbehandlung (Ultraschall+SonoVue®: $41,4 \pm 13,4$ vs. Sham: $45,4 \pm 7,5$; $p=0,20$).

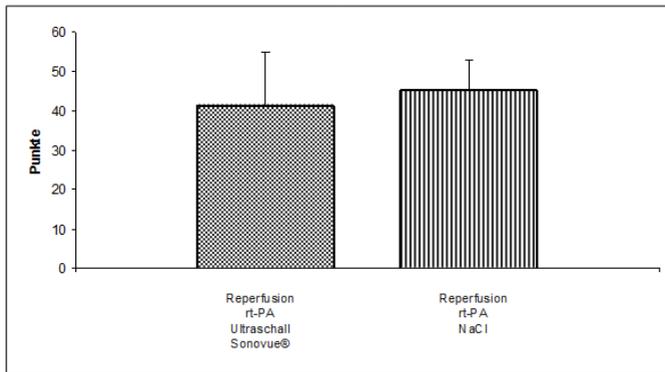


Abb. 35: Graphische Darstellung des Neuroscores nach 24 Stunden

	Gruppe I	Gruppe II
<i>Vorderbeinflexion</i>	19	21
<i>Instabilität bei lateralen Druck</i>	18	21
<i>"Tail hanging"</i>	5	7
<i>Freies Laufen</i>	23	24
<i>Bewegung der Tasthaare</i>	2	
<i>Bewusstsein</i>	1	
<i>Hören</i>		
<i>Sinneswahrnehmung</i>	23	24
<i>Sehvermögen</i>	24	24

Tab. 12: Anzahl der Tiere mit dem jeweiligen neurologischen Befund in den beiden Gruppen nach 24 Stunden

Bei der Betrachtung der einzelnen Testergebnisse zeigten alle Tiere ein intaktes Hörvermögen nach 24 Stunden. Die Defizite in den anderen Tests waren relativ gleichmäßig in den beiden Gruppen verteilt (Tab 12).

2.6.2. Rotarod

Die Differenz der absolvierten Umdrehungen pro Minute auf dem Rotarod vor der Induktion der fokalen Ischämie und nach 24 Stunden (Abb. 36) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Ultraschall+SonoVue®: $8,3 \pm 12,2$ vs. Sham. $11,5 \pm 10,7$).

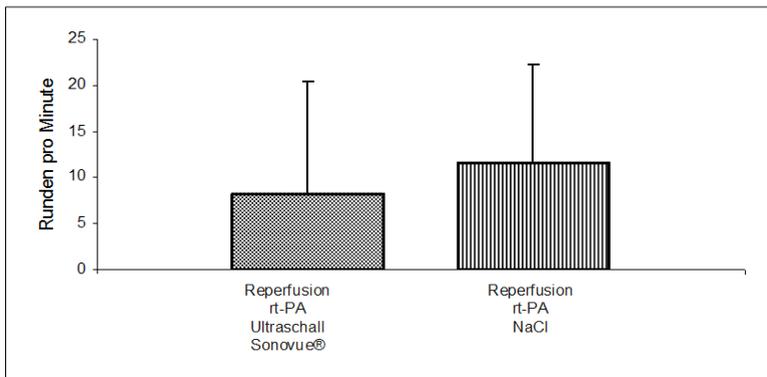


Abb. 36: Graphische Darstellung der Differenz beim Rotarodtest vor Induktion und nach 24 Stunden

3. Experiment III: Zerebrale Temperaturentwicklung während 60 kHz-Beschallung

Die intrakranielle Temperaturentwicklung zeigte einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Tieren mit permanenter Beschallung ($1,11\text{ °C} \pm 0,4$) und den Tieren mit intermittierender Beschallung ($0,17\text{ °C} \pm 0,28$) (Abb. 37). Temperaturunterschiede von unter 1 °C wurden bei den Tieren mit intermittierendem Schall, wie in Studie 1 verwendet, beobachtet, während die permanente Beschallung Temperaturunterschiede von bis zu 4 °C vom Ausgangswert zeigte.

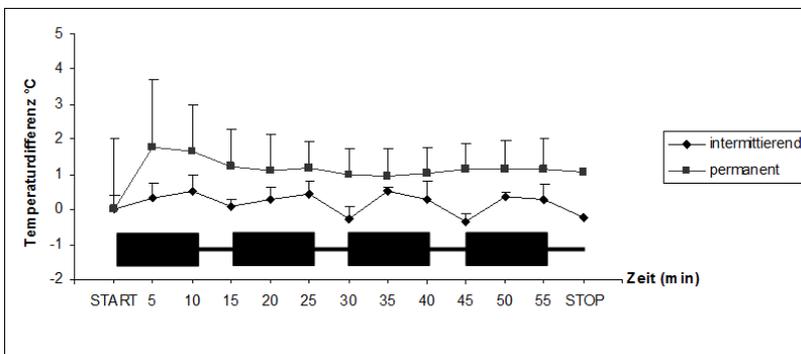


Abb. 37: Gegenüberstellung der intrakraniellen Temperaturentwicklung bei permanenter und intermittierender 60 kHz Beschallung (schwarze Blöcke stellen die Beschallungsphasen bei dem intermittierendem Protokoll dar)^{1,12}

4. Experiment IV: Zerebrale Temperaturentwicklung während 3 MHz-Beschallung

Bei der Beschallung mit 3 MHz konnten maximale Temperaturänderungen von $0,2^{\circ}\text{C}$ (Abb. 38) bezogen auf den Ausgangswert zu Beginn der Beschallung beobachtet werden.

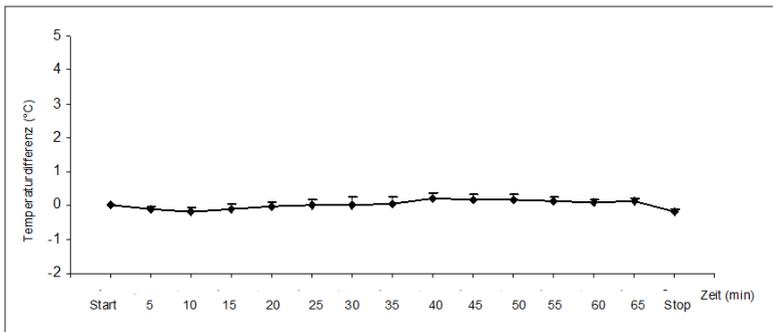


Abb. 38: Darstellung der Temperaturentwicklung bei 3 MHz Beschallung

5. Experiment V: Bildgebung Micro- und Nano-CT nach 3 MHz-Beschallung

Nach Reperfusion der rechten ACM zeigte sich ohne Behandlung in der ipsilateralen Hemisphäre der Versuchstiere im Vergleich zu der nicht okkludierten linken Hemisphäre ein signifikant geringeres vaskuläres Volumen im Nano-CT (Abb. 39) ($p \leq 0,001$), das sowohl unmittelbar als auch 60 Minuten nach der Wiedereröffnung des Gefäßes zu beobachten war. Nach Behandlung mit rt-PA als Infusion über eine Stunde zeigte sich eine Verbesserung des vaskulären Volumenanteils der ischämischen Hemisphäre, wobei der Unterschied zwischen den Hemisphären jedoch weiterhin signifikant blieb ($p < 0,005$). Bei der Behandlung mit rt-PA und 3 MHz-Beschallung in Kombination mit SonoVue[®] für 1 Stunde konnten keine signifikanten Unterschiede im vaskulären Volumenanteil zwischen den beiden Hemisphären mehr detektiert werden ($p > 0,05$).

Hemisphäre ein signifikant geringeres vaskuläres Volumen im Nano-CT (Abb. 39) ($p \leq 0,001$), das sowohl unmittelbar als auch 60 Minuten nach der Wiedereröffnung des Gefäßes zu beobachten war. Nach Behandlung mit rt-PA als Infusion über eine Stunde zeigte sich eine Verbesserung des vaskulären Volumenanteils der ischämischen Hemisphäre, wobei der Unterschied zwischen den Hemisphären jedoch weiterhin signifikant blieb ($p < 0,005$). Bei der Behandlung mit rt-PA und 3 MHz-Beschallung in Kombination mit SonoVue[®] für 1 Stunde konnten keine signifikanten Unterschiede im vaskulären Volumenanteil zwischen den beiden Hemisphären mehr detektiert werden ($p > 0,05$).

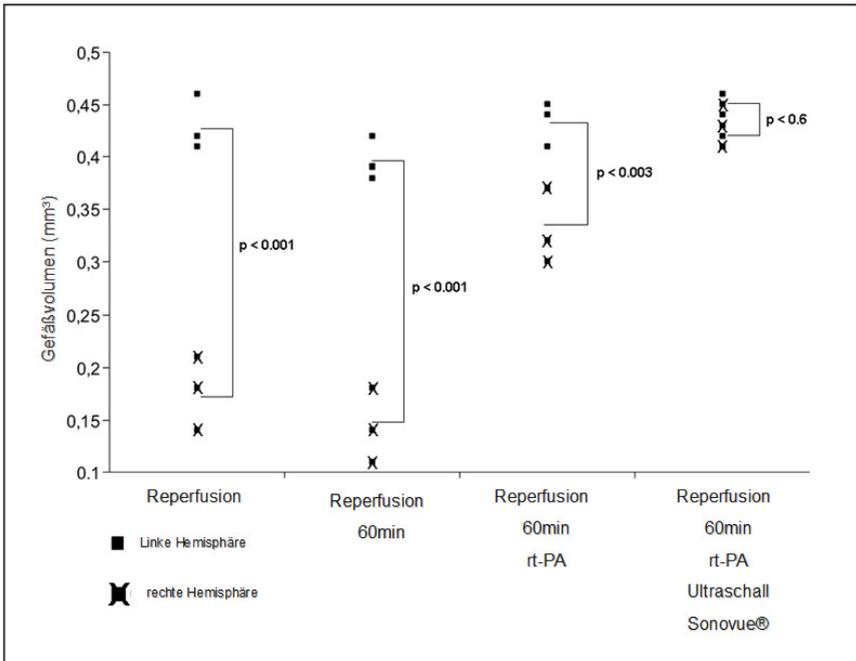


Abb. 39: Vaskulärer Volumenanteil der linken und rechten Hemisphäre in den einzelnen Gruppen¹¹³

Eine vergleichende Mikro- und Nano-CT-angiographische Darstellung der arteriellen zerebralen Vaskularisation nach jeweiliger Behandlung (Abb. 40) zeigte bei unbehandelten Tieren trotz nachweisbarer reperfundierter A. cerebri media einen persistierenden Verschluss der zerebralen Arteriolen und Kapillaren. Bei einer alleinigen Anwendung von rt-PA zeigte sich eine partiell verbesserte Perfusion. Eine

optisch deutlich erkennbare Angleichung der Gefäßsituation der ischämischen Hemisphäre an die kontralaterale Hemisphäre und somit eine komplette Reperfusion konnte nach 60 minütiger rt-PA-Behandlung und Echosignalverstärkern in Kombination mit einer 3 MHz-Beschallung dargestellt werden.

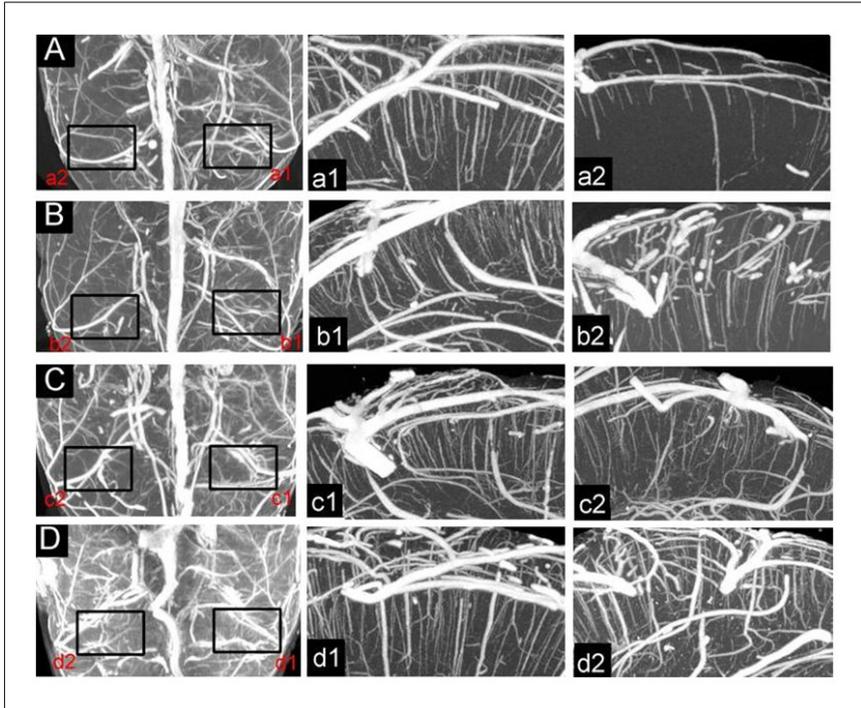


Abb. 40: Maximale-Intensitätsprojektion (MIP) mittels Micro-CT (A-D) und Nano-CT (a1/2-d1/2). Die Bilder a1-d1 bilden die kontralaterale Hemisphäre ab. Die obere Zeile (A, a1, a2) zeigt Bilder unmittelbarer nach Reperfusion. In der zweiten Zeile von oben (B, b1, b2) ist die Situation 60 min nach Reperfusion dargestellt. Die zweite Zeile von unten (C, c1, c2) stellt die Verhältnisse nach 60 min rt-PA-Behandlung dar, während in der letzten Zeile (D, d1, d2) die Verhältnisse nach 60 minütiger rt-PA-Behandlung in Kombination mit einer 3 MHz-Beschallung zu sehen sind¹³

VI. Diskussion

6.1. Einleitung

Die Lysetherapie mittels Ultraschall, die sogenannte "Sonothrombolyse" stellt im Bereich des akuten ischämischen Infarkts eine neue therapeutische Herangehensweise dar, während sie bereits in anderen Bereichen routinemäßig eingesetzt wird. Die besondere Anfälligkeit des Hirngewebes gegenüber hypoxischer Zustände und die Tatsache, dass nur ein Präparat zur Thrombolyse beim Schlaganfall zugelassen ist, verstärken die Bemühungen nach derartigen alternativen Behandlungsmethoden.

Vorangegangene Studien haben allerdings gezeigt, dass neben einer Wirkverbesserung der Thrombolyseraten bei therapeutischem Ultraschall auch mit dem Auftreten von unerwünschten Wirkungen zu rechnen ist. Dies gilt insbesondere für niederfrequente Ultraschallanwendungen. Allerdings wird auch der diagnostische MHz-Ultraschall, der bei diagnostischer Anwendung als sicher einzustufen ist, in therapeutischen Anwendungen in besonderen Protokollen eingesetzt, die lange Beschallungszeiten und wiederholte Gaben von Signalverstärkern vorsehen. Somit ist eine sorgfältige Evaluation von Nebenwirkungen auch hier erforderlich.

Als Kriterien für mögliche unerwünschte Nebenwirkungen werden in dieser Arbeit die Mortalitätsrate, die kernspintomographischen Ergebnisse in Bezug auf Infarkt volumina und Ödembildung, die Ergebnisse der funktionellen Testungen und die postmortalen Befunde herangezogen. Um den potentiellen therapeutischen Nutzen in Kombination mit einer systemischen rt-PA-Behandlung und einem Echosignalverstärker zu ermitteln, werden die ischämischen Läsionsvolumen, die MRT-Befunde, die Ergebnisse der Micro- und Nano-CT-Bildgebung und der neurologische Status nach 24 Stunden betrachtet. Die Gegenüberstellung der verschiedenen Schallprotokolle findet anhand einer Gesamtbetrachtung der vorgenannten Kriterien statt.

6.2. Evaluation potenzieller Nebenwirkungen spezifisch entwickelten 60 kHz-Ultraschalls

In dem hier verwendeten Versuchsaufbau konnten bei beschallten Tieren mittels MRT-Untersuchungen und Histologie signifikant größere Läsionsvolumina sowie Blutungen detektiert werden und die Tiere zeigten ein schlechteres neurologisches Endergebnis. Bei einem Beschallungsprotokoll mit permanentem Modus wurden Temperaturdifferenzen von bis zu 4 °C zum Ausgangswert ermittelt.

Die TRUMBI Studie wurde ohne eine vorherige Sicherheitsstudie durchgeführt und musste abgebrochen werden⁴⁶. In dieser klinischen Studie wurden die 26 Patienten mit akutem Verschluss der A. cerebri media entweder mit einem Therapiegerät in einer Frequenz von 300 kHz in Kombination mit rt-PA behandelt oder nur mit rt-PA behandelt. Das Auftreten intrazerebraler Blutungskomplikationen, auch im nichtischämischen Gewebe, bei 5 Patienten in Kombination mit Ultraschall, führte zum vorzeitigen Abbruch der Studie. Die Resultate von tierexperimentellen Studien, in denen eine transkranielle Beschallung mit einem 20 kHz Ultraschall zu dosisabhängigen Nebenwirkungen in unbehandelten^{33, 133, 162} und vor allem in ischämischen Tieren^{33, 133, 162} führte, werden durch die hier ermittelten Befunde von intrazerebralen Mikroblutungen sowie subarachnoidalen Blutungen untermauert.

Der signifikante Unterschied der Läsionsvolumina zu Ungunsten der Ultraschallgruppe war ein Hauptbefund der Studie. Dieser Unterschied wurde nur in der Gruppe mit temporärem Verschluss festgestellt. In der Gruppe mit einer permanenten Okklusion waren die Volumina vergleichbar. Dies legt einen zusätzlichen schädigenden Effekt von niederfrequentem Ultraschall auf ischämisches, jedoch vitales Gewebe (Penumbra) nahe. Klinische und experimentelle Studien zeigen, dass das Gewebe, welches funktionell und strukturell geschädigt aber dennoch überlebensfähig ist, eher durch pathophysiologische und physikalische Einflüsse gefährdet ist^{26, 68, 156}. Denkbar ist auch eine Verstärkung des Reperfusionsschadens durch den Ultraschall. Die hier erhobenen Daten erlauben keine Rückschlüsse auf den genauen pathophysiologischen Mechanismus. Die nachweisbar fehlende Temperaturerhöhung durch Ultraschall, ein intermittierendes Intervallschema vorausgesetzt, macht einen unmittelbaren Temperatureffekt

unwahrscheinlich. Allerdings lassen sich umschriebene Temperatur-„Hotspots“ durch diese Methodik nicht sicher ausschließen.

Die Beurteilung des Hörvermögens führte zu der höheren Punktzahl in den Neuroscores bei den Tieren mit Ultraschallbehandlung. In dieser Studie wurde erstmalig eine schädigende Wirkung auf das Hörvermögen festgestellt. Der N. vestibulocochlearis ist im MRT nicht sichtbar. Die T2- und ADC-Auswertung des N. trigeminus, stellvertretend für den N. vestibulocochlearis, ergab keine Hinweise auf pathologische Veränderungen. Weiterhin lagen auch keine histologischen Hinweise auf strukturelle Veränderungen vor¹¹⁴. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass im Vorfeld der TRUMBI-Studie Versuche im Ultraschallbereich unterhalb von 40 kHz bei den Probanden zu erheblichen Tinnitus führte und daher eine andere Frequenz gewählt wurde³. Die in dieser Studie erhobenen Befunde erlauben keinen Rückschluss auf eine Schädigung der zentralen Strukturen und lassen eine Schädigung der inneren Ohrstrukturen vermuten. Schädigende Wirkungen durch den Einfluss der mechanischen Energie sind ebenfalls denkbar. Ursache könnte die räumliche Nähe zum Schädelknochen sein. Grenzflächen von Knochen zu weichem Gewebe sind besonders empfänglich für ultraschallinduzierte Erwärmung¹⁰⁶. In dem hier verwendeten experimentellen Set-up könnten auch physikalische Interferenzen aufgetreten sein, die durch die relative Wellenlänge im Verhältnis zu der Größe des Rattenschädels begründet sind. Bei Anwendung an einem menschlichen Schädel können sich stehende Wellen bilden. Diese führen dann zu einer höheren Intensität mit thermalen Wechselwirkungen an den Grenzflächen oder es treten Kavitationen auf.

Die Perfusion, als Maß für die Temperaturregulation, wird durch ischämisches Hirngewebe beeinträchtigt. Eine ultraschallinduzierte Temperaturerhöhung wird auch bei diagnostischen Anwendungen diskutiert¹⁰⁸. Verschiedene experimentelle Studien zur Temperaturentwicklung bei therapeutischem transkraniell Ultraschall haben keine Hinweise auf einen klinisch-relevanten Anstieg der Gehirntemperatur bei Ratten ergeben^{45, 133}.

Auch eine kranielle LF-HE-Ultraschallexposition (185 MHz, 2.0 Watt/cm²) an der Ratte führte nur zu einem Anstieg der Hirntemperatur von etwa 1 °C pro Stunde, was innerhalb des verträglichen Bereiches liegen sollte³⁴.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Nolle und Mitarbeitern bei Anwendung noch niedrigerer Frequenzen berichtet: LF-HE-Ultraschall (20 KHz) führte in einem Rattenmodell zu einem energieabhängigem Anstieg der tympanalen Temperatur, die gut mit der Hirntemperatur korreliert. In dieser Studie war sogar bei maximaler Energie (12 W Output \approx 4.6 W/cm²) ein Temperaturanstieg von höchstens 1,6°C zu beobachten¹¹⁷.

Daffertshofer et al. berichteten ferner, dass die kranielle Applikation gepulsten LF-HE-Ultraschalls (27.5 kHz, 7 W/cm²) zu keinem nennenswerten Anstieg der Hirntemperatur bei Ratten führt³⁴.

In der vorliegenden Studie 1 wurde ein intermittierendes Schallprotokoll angewendet. Die Notwendigkeit für die Verwendung eines intermittierenden Schalls im Gegensatz zu einer permanenten Beschallung konnte in der Studie 3 gezeigt werden. Starke Temperatureffekte im ischämischen Areal konnten durch Verwendung eines intermittierenden Schalls vermieden werden. Die beobachteten Nebenwirkungen in der Studie 1 sind daher eher nicht auf einen Temperatureffekt zurückzuführen. Eine mögliche Erklärung könnten die Effekte sein, die durch die auftretende mechanische Energie bedingt sind, wie die Bildung von freien Radikalen und/oder der auftretenden Kavitationen⁴⁷.

Aufgrund der festgestellten zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen konnte bei dem hier gewählten Beschallungsprotokoll für 60 kHz kein therapeutischer Nutzen definiert werden.

6.3. Evaluation potenzieller Nebenwirkungen therapeutisch eingesetzten diagnostischen 3 MHz- Ultraschalls

In dem verwendeten Versuchsaufbau konnten, trotz der prolongierten Anwendung des diagnostischen Ultraschalls und der Kombinationsbehandlung mit einem Kontrastmittel, die etwaige Kavitationsphänomäne induzieren könnte, keine negativen Effekte mittels neurologischem Outcome, MRT-Untersuchungen, Gehirntemperatur sowie Histologie festgestellt werden.

In dieser Studie wurde nur bei einem Tier eine Blutung festgestellt, wobei kein raumfordernder Effekt oder eine klinische Verschlechterung zu beobachten war.

Die Resultate klinischer Sonothrombolyse-Studien unter Verwendung diagnostischen Schalls werden in Bezug auf das Auftreten intrakranieller Blutungen kontrovers diskutiert.

In der CLOTBUST-Studie wurden 126 Patienten eingeschlossen. Alle wurden mit rt-PA behandelt und die Hälfte zusätzlich mit 2MHz während der Infusionsdauer. Hier zeigten die mit Ultraschall behandelten Patienten den gleichen Anteil von symptomatischen intrazerebralen Blutungen wie unbehandelte Patienten (5%)⁶.

In der Studie von Eggers et al.³⁹ wurden 25 Patienten mit einem Verschuß der A. cerebri media mit rt-PA behandelt und 11 zusätzlich über eine Stunde mit einem 2 MHz Doppler beschallt. Fünf erlitten intrazerebrale Hämatome oder hämorrhagische Transformationen innerhalb des Infarktgebietes. Vier dieser Patienten (36%) waren aus der mit Ultraschall behandelten Gruppe, wobei es bei zwei Personen (18%) zu einer deutlichen klinischen Verschlechterung der Symptomatik kam. Diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

Die bisher durchgeführten klinischen Studien weisen somit eine Häufigkeit symptomatischer intrazerebraler Hämatome zwischen 7.5 und 18% auf. Damit liegt die Blutungskomplikationsrate im Mittel bei 10.4% (11 von 106 Patienten). Angesichts der geringen Fallzahlen und dem häufigen Fehlen von Kontrollgruppen lässt sich diese Komplikationsquote nur durch den Vergleich mit großen rt-PA-Therapiestudien bewerten: In der NINDS-Studie¹⁵¹ lag die Rate symptomatischer intrazerebraler Blutungen in der rt-PA-Gruppe mit 6.4% (in der ECASS-II-Studie⁶⁶ mit 8.8%) deutlich niedriger als in der Metaanalyse der drei o.g. Studien. Über die Häufigkeit „asymptomatischer“ Blutungen und hämorrhagischer Transformationen sowie über das Ausmaß des begleitenden Hirnödems wurden in diesen veröffentlichten klinischen Studien keine Angaben gemacht. Unklar ist daher, ob diese erhöhte Blutungsgefahr als direkte Ultraschallnebenwirkung oder als Folge der erhöhten Rekanalisationsquote interpretiert werden muss.

Als Hinweis auf einen Zusammenhang mit der Rekanalisierungsquote dienen die Ergebnisse einer klinischen Studie mit 296 Patienten. Hier wurden die Probanden der einen Gruppe einer 2 stündigen 2 MHz transkranialen Doppler sonographischen

Untersuchung unterzogen in Kombination mit rt-PA und Echosignalverstärker. Ergebnis dieser Studie war, dass diese Patienten neben einer signifikant höheren Rekanalisierungsquote auch eine höhere Rate von hämorrhagischen Transformationen zeigten, welche aber nicht gleichzusetzen war mit einem erhöhten Risiko einer symptomatischen intrakraniellen Blutung. Das Blutungsausmaß korrelierte mit dem Zeitpunkt der Reperfusion. Diese Befunde gingen einher mit einem verbessertem klinischen Outcome für die Patienten mit Echosignalverstärker-Behandlung³⁸

Bei Patienten konnten während des Routineeinsatzes von transkraniellem Ultraschall keine Temperaturveränderungen ermittelt werden¹³².

Während der einstündigen Beschallung fanden sich maximale einzelne Temperaturwerte (im Verhältnis zur Ausgangstemperatur) von 0,4°C. Diese Ergebnisse der Temperaturmessungen im Gehirn nach der Beschallung mit 3 MHz stehen im Widerspruch zu den von Nakagawa et al¹⁰⁸ ermittelten Temperaturänderungen von bis zu 2,41°C, die bei der Beschallung von 2 MHz mit einem Doppler-Ultraschall bei gesunden Kaninchen beobachtet wurden. Begründet werden könnten diese Befunde durch den technischen Aufbau bei Nakagawa et al, bei dem die Sonde direkt auf dem Schädel positioniert wurde. Dieser direkte Kontakt kann zu einer Wärmeübertragung von der Sonde über den Schädelknochen zum Gehirn geführt haben, was in hiesigem Versuchsaufbau durch die Vorlaufstrecke verhindert wurde.

6.3.1. Therapeutischer Nutzen bei 3 MHz

Die Micro- und Nano-CT-Bildgebung zeigte einen persistierenden Verschluss der zerebralen Arteriolen und Kapillaren auch nach erfolgter Reperfusion. Erklären lässt sich dieser pathologische Zustand durch zwei unterschiedliche Theorien. Bei dem No-Reflow-Phänomen geht man von einer Lumenverlegung durch Plättchen oder Erythrozytenaggregation aus. Erhöhte Viskosität, Koagulation und Kompression der Kapillaren durch Ödemformation spielen ebenfalls eine Rolle¹⁵³. Die Hyperämie-Hypoperfusion-Theorie beschreibt die reaktive Hyperämie nach einer Reperfusion mit nachfolgender Hypoperfusion. Ausgangspunkt für diese Abfolge sind die während der Ischämie akkumulierenden Metabolite Adenosin, K⁺, H⁺, CO₂ und die

geschädigten metabolischen Prozesse für deren Abbau. Diese wirken vasodilatativ¹⁵³. Die alleinige Anwendung von rt-PA führte zu einer partiell verbesserten Perfusion. Während einer Ischämie kommt es zur erhöhten Permeabilität. In Folge kann es zu einer lokalen Fibrinbildung kommen, welche zur mikrovaskulären Obstruktion beitragen kann¹¹⁸. Dieser Aspekt, wäre eine mögliche Erklärung für diese partielle Verbesserung. Eine komplette Reperfusion konnte nur nach der Anwendung von rt-PA, Echosignalverstärkern und Ultraschall beobachtet werden. Diese kombinierte Behandlung führte ebenfalls zu einem signifikant reduzierten Läsionsvolumen verglichen mit der rt-PA Monotherapie (Studie 2). Somit ließ sich in dieser Studie nachweisen, dass eine kontrastverstärkte Sonothrombolyse über die reine Wirkung an thrombotisch verschlossenen arteriellen Gefäßhauptstämmen auch zu einer signifikanten Verbesserung der Perfusion auf der Ebene der Mikrozirkulation führen kann. Hierdurch ergibt sich potenziell eine Behandlungsmöglichkeit eines klinisch relevanten Problems, nämlich der fehlenden kompletten Reperfusion der Hemisphäre nach erfolgreicher Behandlung des Gefäßhauptstammverschlusses.

Zahlreiche Studien *in vitro*^{35, 81, 149} und *in vivo*^{30, 31, 116} belegen, dass eine zusätzliche Verstärkung des Ultraschalleffekts auf die enzymatische Thrombolyse durch die Zugabe von Ultraschallechokontrastmitteln erzielbar ist.

Molina et al.¹⁰² haben das Echokontrastmittel Levovist® bei Patienten angewendet und stellten eine bessere Thrombolyse und die damit einhergehende verbesserte Rekanalisationsquote fest. Perren et al.¹²¹ zeigten, dass die Kombination von Ultraschall und Echosignalverstärkern zu einem verbesserten klinischen Outcome führte. In beiden Studien wurde kein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung von intrakraniellen Blutungen festgestellt.

Diese Ergebnisse unterstützen die sichere Anwendbarkeit der kontrastverstärkten Sonothrombolyse im MHz-Bereich, insbesondere in Bezug auf das Auftreten intrakranieller Blutungen.

In-vitro Untersuchungen mit radioaktiv markiertem, inaktiviertem rt-PA zeigten, dass Ultraschall (1.0 MHz) den Transport des Enzyms in künstlich erzeugte Thromben beschleunigt⁹⁶ und die Bindung von rt-PA an Fibrin erhöhen kann¹³⁵. Braaten und Mitarbeiter konnten anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen nachweisen,

dass eine Ultraschallexposition von 1.0 MHz zu einer reversiblen Disaggregation langer Fibrinfasern in kürzere Segmente führen kann²⁴. Dieser Befund könnte das erleichterte und tiefere Eindringen von rt-PA in Thromben erklären^{46, 135}. Ferner scheint die Induktion von Kavitationsphänomenen eine wesentliche Rolle bei der ultraschallverstärkten enzymatischen Thrombolyse zu spielen^{43, 100}.

6.4. Schlussfolgerung

Für die Durchführung der Sonothrombolyse gibt es zwei verschiedene Herangehensweisen. Die Verwendung von speziell für diese Indikation entwickelten niederfrequenten Geräten oder die Anwendung von bereits für die transkranielle Applikation zugelassenen hochfrequenten Diagnostikgeräten. Die Sicherheit von Ultraschall als Methode in der angewandten Medizin berücksichtigt lediglich die zur Diagnostik zugelassenen Geräte. Diese Doppler- und Duplexgeräte werden im MHz-Bereich mit geringen Intensitäten betrieben.

Die abgebrochene TRUMBI-Studie untermauert die Bedeutung, vor einer klinischen Evaluation neuartiger Verfahren zunächst eine ausführliche tierexperimentelle Evaluation durchzuführen. So zeigte sich in einer in vitro Studie eine deutliche thrombolytische Wirksamkeit von 20 kHz bei verschiedenen Intensitäten.¹¹⁰ Dort kam es zu einer vollständigen Zerstörung von 8 der 10 Thromben bei einer Intensität von 1,2 W/cm². Im Tierversuch zeigten sich jedoch bereits ab einer Intensität von $\geq 0,5$ W/cm² deutliche Nebenwirkungen. Die Ausbildung eines zytotoxischen und vasogenen Ödems zeigte sich bei klinisch gesunden Ratten¹³³. Bei einer Intensität von 2,6 W/cm² zeigten sich umschriebene Nekrosen des Hirnparenchyms¹³³. Bei Versuchen mit Tieren mit ischämischen Hirninfarkten zeigte sich eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate in den Gruppen der beschallten Tiere¹⁶². Die schädigende Wirkung von niederfrequentem Ultraschall bestätigt sich deutlich in den hier durchgeführten Experimenten. Erstmals wurde ein schädigender Einfluss auf das Hörvermögen von beschallten Tieren demonstriert.

Mit zunehmender Zeitspanne vom Ischämieereignis bis zur Therapieeinleitung nimmt das medikamentös bedingte Einblutungsrisiko in das Ischämieareal zu. Die Grundidee für dieses Patientenkollektiv eine Therapiemethode zu entwickeln welche unabhängig vom Gerinnungssystem arbeitet führt zum experimentellen Einsatz von

vorhandenen Therapiegeräten. In einer Studie konnte eine verbesserte Rekanalisation in der Gruppe mit transkraniellem Farbduplex im Vergleich zur Placebogruppe ermittelt werden⁴¹.

Das durch Ultraschall forcierte Eindringen des Fibrinolytikums in den Thrombus und die daraus resultierende vergrößerte Wirkoberfläche bezeichnet einen elementaren Wirkmechanismus¹³⁵. Die Auswertung der Micro- und Nano-CT-Untersuchungen der hier durchgeführten Experimente belegen deutlich den Therapieerfolg einer medikamentösen Behandlung, jedoch zeigen sie ebenso deutlich die Wirksteigerung auf mikrovaskulärer Ebene in Verbindung mit hochfrequentem Ultraschall. Diese Funde untermauern und illustrieren die Studien, welche auf die therapeutische Nutzbarkeit der Signalverstärker hinweisen^{102, 121}.

Es zeigt sich, dass sich die Wirkung von Ultraschall nicht pauschalisieren lässt und eine genaue Evaluierung aller technischen Parameter erfolgen muss. Neben der gewählten Frequenz muss auch die angewandte Intensität, Modus und Dauer der Behandlung ermittelt werden und in unabdingbaren Tierversuchen auf mögliche Nebenwirkungen getestet werden.

Die vorliegende Arbeit bietet eine Grundlage zur Entwicklung therapeutischer Ultraschallbehandlungen, wobei nach gegenwärtigem Kenntnisstand die Anwendung von hochfrequenten Geräten vorzuziehen ist. Der therapeutische Erfolg durch eine kombinierte Anwendung mit rt-PA kann durch die zusätzliche Gabe von Echosignalverstärkern verstärkt werden, wobei weitere Untersuchungen zu den verschiedenen, auf dem Markt befindlichen, Produkten noch ausstehen.

VII. Zusammenfassung

Der Schlaganfall zählt zur häufigsten Ursache einer dauerhaften Behinderung und in den Industrieländern zu der teuersten Krankheit überhaupt. In Deutschland stellt er die dritthäufigste Todesursache dar.

Für die Entwicklung neuer Therapiemethoden zur Behandlung des akuten Schlaganfalls und zur Prüfung von möglichen unerwünschten Nebenwirkungen sind tierexperimentelle Studien essentiell.

Derzeit existiert nur ein Medikament (rt-PA) zur rekanalisierenden Therapie beim akuten Schlaganfall. Neben der eingeschränkten Wirksamkeit wird die Anwendung durch ein strenges Zeitfenster und eine Vielzahl von weiteren medizinischen Kontraindikationen begrenzt, so dass diese Therapie nur bei 2-5% der Patienten eingesetzt werden kann. Dies ist Ausgangspunkt für die Entwicklung von alternativen Behandlungsmethoden. Die Sonothrombolyse stellt dabei eine mögliche Therapieoption dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Gegenüberstellung einer nieder- und hochfrequenten Ultraschallbehandlung, die Erfassung von möglichen unerwünschten Nebenwirkungen und die Evaluation des therapeutischen Nutzens in Kombination mit rt-PA.

Im ersten Experiment wurden Ratten mit einem permanenten oder transienten Verschluss der A. cerebri media mit rt-Pa behandelt und 60 Minuten mit 60 kHz beschallt oder erfuhren eine Sham-Prozedur ohne Beschallung. Dabei zeigten die beschallten Tiere eine höhere Mortalitätsrate, signifikant größere Infarktvolu-men und ein schlechteres neurologisches Outcome. Zusätzlich wiesen die beschallten Tiere eine Beeinträchtigung des Hörvermögens auf.

Im zweiten Experiment wurden Tiere mit einer transienten Ischämie einer 60-minütigen 3 MHz Beschallung oder Sham-Prozedur unterzogen. Die beschallten Tiere wurden gleichzeitig mit rt-PA sowie einem Echosignalverstärker (SonoVue®) behandelt, während die Sham-Gruppe nur rt-PA erhielt. Bei der Auswertung zeigten die Tiere mit der Kombinationsbehandlung von Ultraschall, rt-PA und

Signalverstärker signifikant kleinere Infarktvolumen und signifikant geringere Ödembildung.

Um mögliche Temperatureffekte bei den gewählten Beschallungsintervallen zu erfassen, wurde in einer weiteren Versuchsanordnung eine intrakranielle Temperaturmessung durchgeführt.

Ein Experiment diente dazu die intrakranielle Temperaturentwicklung während einer 60 minütigen Beschallung mit 60 kHz zu dokumentieren. Dabei wurde eine Gruppe einer permanenten Beschallung und die zweite Gruppe einer intermittierenden Beschallung unterzogen. Die Ergebnisse zeigten, dass eine intermittierende Beschallung zu einer intrakraniellen Temperaturerhöhung von unter 1°C führt. Die Wahl eines permanenten Beschallungsmuster dagegen zu einer Erhöhung von bis zu 4,6°C.

Während einer 60 minütigen Beschallung mit 3 MHz konnte eine Temperaturerhöhung von durchschnittlich 0,2°C dokumentiert werden.

Zur Dokumentation des Gefäßstatus und zur Ermittlung des vaskulären Volumenanteils in den beiden Hemisphären wurden separate Micro- und Nano-CT-Untersuchungen durchgeführt. Es wurden vier Gruppen gebildet. Präparation unmittelbar nach Reperfusion, 60 Minuten nach Reperfusion, 60 Minuten nach Reperfusion mit erfolgter rt-PA Behandlung und 60 Minuten nach Reperfusion mit erfolgter rt-PA Behandlung in Kombination mit 3 MHz Ultraschall und Signalverstärker.

Hierbei zeigte sich, dass es trotz erfolgter Reperfusion des Mediahauptstamms (Entfernen des Fadens) zu einer anhaltenden hemisphäriellen Minderperfusion durch Obstruktion der Mikrozirkulation kommt („no reflow“-Phänomen). Dieses Phänomen ließ sich durch rt-PA partiell behandeln. In der Gruppe der Tiere mit erfolgter rt-PA Behandlung in Kombination mit Ultraschall und Signalverstärker kam es zu einer kompletten hemisphäriellen Reperfusion. Dies belegt, dass die Sonothrombolyse über die Wirkung am Hauptstamm hinaus Perfusionsdefizite auf Ebene der Mikrozirkulation erfolgreich behandeln kann.

Die Ergebnisse der Studien zeigen, neben einer sicheren Anwendung, auch einen deutlichen Vorteil bei der Nutzung von hochfrequentem Ultraschall zur Behandlung

beim ischämischen Schlaganfall in Begleitung einer rt-PA-Infusion. Der therapeutische Erfolg wird durch die Kombination des hier eingesetzten Echosignalverstärkers potenziert.

VIII. Summary

Stroke belongs to the most frequent causes of maintaining invalidity and is the most expensive medical condition in the industrial countries. In Germany it is the third common cause of death.

To develop new therapy techniques for acute stroke and to investigate probable undesirable side effects animal experiments are essential and enable an optimized transmission of research results to clinical studies.

Presently only one drug (Alteplase[®]) is licensed for the recanalizing therapy of acute stroke. In addition to the limited effectiveness the use is restricted by a narrow time frame and a multitude of medical indications. This allows only an application to 2-5% of the patients. This is the starting point for the investigation of alternative therapy techniques. Sonothrombolysis is one possibility.

Aim of the present doctoral thesis was the comparison of a low- and a high-frequency ultrasound therapy, the survey of possible side effects and the evaluation of the therapeutical benefit in combination with Alteplase[®] and SonoVue[®].

In the first experiment rats with a permanent and a transient ischemia model were treated with Alteplase[®] and underwent a 60 minute 60 kHz ultrasound or sham procedure. In the ultrasound group the mortality rate was higher, the animals had significantly larger infarct volumes and a worse neurological outcome. The ultrasound treated animals had an impairment of hearing.

In the second setup animals with a transient ischemia model underwent a 60 minutes 3 MHz ultrasound treatment or sham procedure. The ultrasound group was concurrently treated with Alteplase[®] and SonoVue[®]. The sham group only received Alteplase[®]. The analysis of the results showed that animals treated with ultrasound, Alteplase[®] and SonoVue[®] had significantly smaller infarct volumes and edema formation.

To survey possible side effects caused by temperature influences the intracranial temperature was registered in a further setup.

One experiment evaluated the intracranial temperature during ultrasound treatment with 60 kHz over 60 minutes. One group was treated with a permanent ultrasound procedure and the second group with an intermittent ultrasound procedure. A temperature rise of less than 1°C was noted in the group with intermittent procedure and up to 4,6°C with permanent procedure.

During the treatment over 60 minutes with 3 MHz ultrasound a temperature rise at an average of 0,2°C was registered.

To study the vascular condition and the differences in the total vascular volume fraction between the hemispheres an analysis in Micro- and Nano-CT was performed. Four groups were built. Preparation immediately after reperfusion, 60 minutes after reperfusion, 60 minutes after reperfusion and with an Alteplase® infusion and 60 minutes after reperfusion and with performed ultrasound treatment with 3 MHz and Alteplase® and SonoVue® treatment.

Only the group with reperfusion, ultrasound treatment combined with Alteplase® and SonoVue® treatment showed no significant differences in the vascular volume fraction between the right and left hemisphere.

The results of these studies show a notable benefit in stroke treatment using ultrasound in high frequencies and Alteplase®. This benefit is enhanced when combined with SonoVue®.

IX. Abkürzungen

A.	Arterie
AA.	Arterien
Abb.	Abbildung
ADC	Apparent Diffusion Coefficient (Diffusionskoeffizient des Wassers)
ATP	Adenosin-Triphosphat
BGBL	Bundesgesetzblatt
BV	gesamtes Gehirnvolumen
cAMP	zyklische Adenosin-Monophosphat
CBF	zerebraler Blutfluss
CCD	Charge-coupled Device
CT	Computertomographie
FWHM	Halbwertsbreite des Wassersignals
g	Gramm
GG	Grundgesetz
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science
h	Stunde
HLV	Läsionsvolumen der Hemisphäre
HLVe	ödemkorrigiertes Läsionsvolumen der Hemisphäre
HLVu	unkorrigiertes Läsionsvolumen der Hemisphäre
HVc	contralaterales Hemisphärenvolumen
HVi	ipsilaterales Hemisphärenvolumen

Hz	Hertz
L	Liter
LV	Läsionsvolumen
MCA	A. cerebri media
MCAO	Okklusion der A. cerebri media
min	Minute
m	Meter
MRT	Magnetresonanztomographie
OP	Operation
ROI	regions of interest
rt-PA	rekombinanter „tissue-type“ Plasminogen Aktivator
TE	Echozeit
t-PA	tissue Plasminogen Aktivator
TR	Repetitionszeit
W	Watt

X. Literaturverzeichnis

1. Akiyama M, Ishibashi T, Yamada T, Furuhashi H. Low-frequency ultrasound penetrates the cranium and enhances thrombolysis in vitro. *Neurosurgery*. 1998;43:828-833
2. Akiyama M, Ishibashi T, Yamada T, Furuhashi H. Low-frequency ultrasound penetrates the cranium and enhances thrombolysis in vitro. *Neurosurgery*. 1998;43:828-832; discussion 832-823
3. Alexandrov AV. Ultrasound enhanced thrombolysis for stroke. *International Journal of Stroke*. 2006;1:26-29
4. Alexandrov AV. Ultrasound-enhanced thrombolysis for stroke: Clinical significance. *Eur J Ultrasound*. 2002;16:131-140
5. Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA, Christou I, Barber PA, Burgin WS, Malkoff M, Wojner AW, Grotta JC. High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tpa infusion when continuously monitored with 2-mhz transcranial doppler monitoring. *Stroke*. 2000;31:610-614
6. Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Saqqur M, Demchuk AM, Moya LA, Hill MD, Wojner AW. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2004;351:2170-2178
7. Allegrini P. *Imaging in: Krinke gj (hersg.) the laboratory rat*. Stein, Schweiz: Academic Press; 2000.
8. Ariani M, Fishbein MC, Chae JS, Sadeghi H, Michael AD, Dubin SB, Siegel RJ. Dissolution of peripheral arterial thrombi by ultrasound. *Circulation*. 1991;84:1680-1688
9. Arvin BN, Barone F, Feuerstein G. The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biohav Rev*. . 1996;20:445-452
10. Astrup JS, Siesjö, BK. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981;12:723-725
11. Atar S, Luo H, Nagai T, Sahm RA, Fishbein MC, Siegel RJ. Arterial thrombus dissolution in vivo using a transducer-tipped, high-frequency ultrasound catheter and local low-dose urokinase delivery. *J Endovasc Ther*. 2001;8:282-290
12. Ayata CR. Ischaemic brain edema. *J Clin Neurosci*. 2002;9:113-124
13. Beauchamp NJ, Barker PB, Wang PY, vanZijl PC. Imaging of acute cerebral ischemia. *Radiology*. 1999;212:307-324
14. Behrens S, Daffertshofer M, Spiegel D, Hennerici M. Low-frequency, low-intensity ultrasound accelerates thrombolysis through the skull. *Ultrasound Med Biol*. 1999;25:269-273

15. Behrens S, Spengos K, Daffertshofer M, Schroeck H, Dempfle CE, Hennerici M. . Transcranial ultrasound-improved thrombolysis: Diagnostic vs. Therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 2001;27:1683-1689
16. Belayev L, Alonso O, Busto R, Zhao W, Ginsberg M. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke.* 1996;27:1616-1622
17. Benveniste H, Hedlund LW, Johnson GA. Mechanism of detection of acute cerebral ischemia in rats by diffusion-weighted magnetic resonance microscopy. *Stroke.* 1992;23:746-754
18. Berlit P. *Klinische Neurologie. Mit 382 tabellen.* Springer Medizin; 2006.
19. Berrouschot J, Sterker M, Bettin S, Koster J, Schneider D. Mortality of space-occupying ('malignant') middle cerebral artery infarction under conservative intensive care. *Intensive Care Med.* 1998;24:620-623
20. Blinc A, Francis CW, Trudnowski JL, Carstensen EL. Characterization of ultrasound-potentiated fibrinolysis in vitro. *blood.* 1993;81:2636-2643
21. Block F. Neuroprotektion in stroke. A critical overview. *Nervenarzt.* 1999;70:101-110
22. Böhme G. *Zentralnervensystem. In: G b (hersg.). Nickel, schummer, seiferle: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 4: Nervensystem, Sinnesorgane, endokrine Drüsen.* Verlag Paul Parey; 1992.
23. Bonita R. Epidemiology of stroke. *Lancet.* 1992;339:342-344
24. Braaten JV, Goss RA, Francis CW. Ultrasound reversibly disaggregates fibrin fibers. *Thromb Haemost.* 1997;78:1063-1068
25. Busza AL, Allen KL, King MD, van Bruggen N, Williams SR, Gadian DG. Diffusion-weighted imaging studies of cerebral ischemia in gerbils. Potential relevance to energy failure. *Stroke.* 1992;23:1602-1612
26. Capes S, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein H. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: A systematic overview. *Stroke.* 2001;32:2426-2432
27. Cintas P, Le Traon, AP, Larrue, V. High rate of recanalization of middle cerebral artery occlusion during 2-mhz transcranial color-coded doppler continuous monitoring without thrombolytic drug. *Stroke.* 2002;33:626-628
28. Clark WM, Wissman S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S. Recombinant tissue-type plasminogen activator (alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The atlantis study: A randomized controlled trial. Alteplase thrombolysis for acute noninterventional therapy in ischemic stroke. *JAMA.* 1999;282:2019-2026
29. Cohen HW, Jacobson R. Catecholamine content of cerebral tissue after occlusion or manipulation of middle cerebral artery in cats. *J Neurosurg.* 1975;42:32-36

30. Culp WC, Erdem E, Roberson PK, Husain MM. Microbubble potentiated ultrasound as a method of stroke therapy in a pig model: Preliminary findings. *J Vasc Interv Radiol.* 2003;14:1433-1436
31. Culp WC, Porter TR, McCowan TC, Roberson PK, James CA, Matchett WJ, Moursi M. Microbubble-augmented ultrasound declotting of thrombosed arteriovenous dialysis grafts in dogs. *J Vasc Interv Radiol.* 2003;14:343-347
32. Daffertshofer M, Fatar M. Therapeutic ultrasound in ischemic stroke treatment: Experimental evidence. *Eur J Ultrasound.* 2002;16:121-130
33. Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P, Sitzer M, Sliwka U, Els T, Sedlaczek O, Koroshetz WJ, Hennerici MG. Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia: Increased risk of hemorrhage with combined ultrasound and tissue plasminogen activator: Results of a phase ii clinical trial. *Stroke.* 2005;36:1441-1446
34. Daffertshofer M, Hennerici M. Ultrasound in the treatment of ischaemic stroke. *Lancet Neurol.* 2003;2:283-290
35. Dhond MR, Nguyen TT, Dolan C, Pulido G, Bommer WJ. Ultrasound-enhanced thrombolysis at 20 khz with air-filled and perfluorocarbon-filled contrast bispheres. *J Am Soc Echocardiogr.* 2000;13:1025-1029
36. Diener HC, Allenberger J-R. *Schlaganfall, 90 tabellen.* Thieme Verlag; 2004.
37. Diener HCF. *Schlaganfall.* Georg Thieme Verlag; 2002.
38. Dinia L, Rubiera M, Ribo M, Maisterra O, Ortega G, del Sette M, Alvarez-Sabin J, Molina CA. Reperfusion after stroke sonothrombolysis with microbubbles may predict intracranial bleeding. *Neurology.* 2009;73:775-780
39. Eggers J, Koch B, Meyer K, Konig I, Seidel G. Effect of ultrasound on thrombolysis of middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol.* 2003;53:797
40. Eggers J, Konig I, Koch B, Handler G, Seidel G. Sonothrombolysis with transcranial color-coded sonography and recombinant tissue-type plasminogen activator in acute middle cerebral artery main stem occlusion: Results from a randomized study. *Stroke.* 2008;39:1470-1475
41. Eggers J, Seidel G, Koch B, Konig I. Sonothrombolysis in acute ischemic stroke for patients ineligible for rt-pa. *Neurology.* 2005;64:1052-1054
42. Engelhorn T, Doerfler A, Kastrup A, Beaulieu C, de Crespigny A, Forsting M, Moseley ME, Faraci FM. Decompressive craniectomy, reperfusion, or a combination for early treatment of acute "malignant" cerebral hemispheric stroke in rats? Potential mechanisms studied by mri. *Stroke.* 1999;30:1456-1463
43. Everbach EC, Francis CW. Cavitation mechanisms in ultrasound-accelerated thrombolysis at 1 mhz. *Ultrasound Med Biol.* 2000;26:1153-1160
44. Ewen K. *Moderne Bildgebung.* Stuttgart: Thieme; 1997.

45. Fatar M, Stroick M, Griebe M, Alonso A, Hennerici M, M D. Brain temperature during 340-khz pulsed ultrasound insonation: A safety study for sonothrombolysis. *Stroke*. 2006;37:1883-1887
46. Fiebich JB, Schellinger PD. Local and systemic thrombolysis in acute stroke. *Imaging decisions*. 2003;4:26-30
47. Fowlkes J, Holland C. Mechanical bioeffects from diagnostic ultrasound: Aium consensus statements. American institute of ultrasound in medicine. *J Ultrasound Med*. 2000;19:69-72
48. Francis CW. Ultrasound-enhanced thrombolysis. *Echocardiography*. 2001;18:239-246
49. Francis CW, Blinc A, Lee S, Cox C. Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. *Ultrasound Med Biol*. 1995;21:419-424
50. Francis CW, Onundarson PT, Carstensen EL, Blinc A, Meltzer RS, Schwarz K, Marder VJ. Enhancement of fibrinolysis in vitro by ultrasound. *J Clin Invest*. 1992;90:2063-2068
51. Frey H-H, Löscher, W. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Stuttgart: Enke; 2002.
52. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M, Ahuja A, Callahan F, Clark WM, Silver F, Rivera F. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The proact ii study: A randomized controlled trial. Prolyse in acute cerebral thromboembolism. *JAMA*. 1999;282:2003-2011
53. Furlan A, Katzan I, Caplan L. Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2003;5:171-180
54. Geneser F, Schwerdtfeger, W. *Histologie*. Köln: Dt. Ärzte-Verl.; 1990.
55. Gerriets T, Stolz E, König S, Babacan S, Fiss I, Jauss M, Kaps M. Sonographic monitoring of midline shift in space-occupying stroke: An early outcome predictor. *Stroke*. 2001;32:442-447
56. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M, Bachmann G. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke*. 2004;35:566-571
57. Gerriets T, Walberer M, Ritschel N, Tschernatsch M, Mueller C, Bachmann G, Schoenburg M, Kaps M, Nedelmann M. Edema formation in the hyperacute phase of ischemic stroke. *J Neurosurg*. 2009;111:1036-1042
58. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*. 1989;20:1627-1642
59. Granger DK. Leukocyteendothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol*. 1993;71:67-75

60. Greis C. Technology overview: Sonovue (bracco, milan). *Eur Radiol.* 2004;14[S8]:11-15
61. Groggaard B, Schurer L, Gerdin B, Arfors KE. Delayed hypoperfusion after incomplete forebrain ischemia in the rat. The role of polymorphonuclear leukocytes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989;9:500-505
62. Grunst S, Schramm A. Neurologie und psychiatrie. Basislehrbuch gesundheit und krankheit. 2004:38-40
63. Gu WB, Jiang W, Wester P. A photothrombotic ring stroke model in rats with remarkable morphological tissue recovery in the region at risk. *Exp Brain Res.* . 1999;125:171-183
64. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2008;359:1317-1329
65. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The european cooperative acute stroke study (ecass). *JAMA.* 1995;274:1017-1025
66. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donnan G, Schneider D, Diez-Tejedor E, Trouillas P. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ecass ii). Second european-australasian acute stroke study investigators. *Lancet.* 1998;352:1245-1251
67. Hacke WS, Horn, M, Spranger, M, De Georgia, M, von Kummer, R. . "Malignant" middle cerebral artery territory infarction: Clinical course and prognostic signs. *Arch Neurol.* 1996;53:309-315
68. Hajat C, Hajat S, Sharma P. Effects of poststroke pyrexia on stroke outcome: A meta-analysis of studies in patients. *Stroke.* 2000;31:410-414
69. Hallenbeck JM, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Kumaroo KK, Thompson CB, Obrenovitch TP, Contreras TJ. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke.* 1986;17:246-253
70. Hamann G. Der akute hirnfarkt: Pathophysiologie und moderne therapiekonzepte. *Radiologie.* 1997;37:843-852
71. Hamm CW, Steffen W, Terres W, de Scheerder I, Reimers J, Cumberland D, Siegel RJ, Meinertz T. Intravascular therapeutic ultrasound thrombolysis in acute myocardial infarctions. *Am J Cardiol.* 1997;80:200-204
72. Hartmann A. *Der Schlaganfall. Pathogenese, klinik, diagnostik und therapie akuter zerebrovaskulärer erkrankungen.* Darmstadt: Steinkopff; 2001.
73. Heiland SS. Magnetresonanztomographie beim Schlaganfall-methodische Grundlagen und klinische Anwendung. *Fortschr Röntgenstr.* 1999;171(1):3-14

74. Henning E, Latour L, Hallenbeck J, S. W. Reperfusion-associated hemorrhagic transformation in shr rats: Evidence of symptomatic parenchymal hematoma. *Stroke*. 2008;39:2765-2768
75. Hombach V, Bartel, T. *Interventionelle Kardiologie, Angiologie und Kardiovaskularchirurgie. Technik, klinik, therapie.* . Schattauer; 2001.
76. Hong AS, Chae JS, Dubin SB, Lee S, Fishbein MC, Siegel RJ. Ultrasonic clot disruption: An in vitro study. *Am Heart J*. 1990;120:418-422
77. Jovin TW. *Acute stroke*. Philadelphia: Butterworth Heinemann; 2003.
78. Kauffmann GWM, E; Sauer, R. *Radiologie. Mit 115 Tabellen ; Fragen und Antworten ; [inkl. Cd-rom das gehirn im nmr-bild]* München: Elsevier Urban & Fischer.; 2006.
79. Klinke RB, C. *Lehrbuch der Physiologie. 52 tabellen*. Stuttgart: Thieme; 2000.
80. Koizumi JY, Nakazawa T, Ooneda G. 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*. 1986;8:1-8
81. Kondo I, Mizushige K, Ueda T, Masugata H, Ohmori K, Matsuo H. Histological observations and the process of ultrasound contrast agent enhancement of tissue plasminogen activator thrombolysis with ultrasound exposure. *Jpn Circ J*. 1999;63:478-484
82. König HE. *Organe, Kreislauf- und Nervensystem*. Stuttgart: Schattauer; 2002.
83. Kornowski R, Meltzer, RS, Chernine, A, Vered, Z, Battler, A. Does external ultrasound accelerate thrombolysis? Results from a rabbit model. *Circulation*. 1994;89:339-344
84. Kuge YM, Yamaguchi T, Miyake Y. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1995;26:1655-1658
85. Lachmann LB, Dinarello, CA. Growth promoting effect of recombinant il-1 and tnf for human astrocyte cell line. *J Immunol*. 1987;138:2913-2916
86. Langhorne P. How do stroke units improve patient outcomes? *Stroke*. 1997;28:2139-2144
87. Laubenberger T, Laubenberger, Theodor; Laubenberger, Jörg. *Technik der medizinischen radiologie. Diagnostik, Strahlentherapie, Strahlenschutz ; für Ärzte, Medizinstudenten und MTRA*. Köln: Dt. Ärzte-Verl.; 2008.
88. Lauer C, Burge, R, Tang, DB, Bass, BG, Gomez, ER, Alving, BM. Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis. . *Circulation*. 1992;86:1257-1264
89. Lauer CG, Burge R, Tang DB, Bass BG, Gomez ER, Alving BM. Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis. *Circulation*. 1992;86:1257-1264
90. Leighton TG. What is ultrasound? *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;93:3-83

91. Li F, Omae T, Fisher M. Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke*. 1999;30:2464-2470
92. Li Y, Chopp M, Jiang N, Yao F, Zaloga C. Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995;15:389-397
93. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4:399-415
94. Löffler G. *Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 1997.
95. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84-91
96. Luo H, Steffen W, Cercek B, Arunasalam S, Maurer G, Siegel RJ. Enhancement of thrombolysis by external ultrasound. *Am Heart J*. 1993;125:1564-1569
97. Massalme S. *Crashkurs Pathologie. Repetitorium zum Gegenstandskatalog 3 mit Einarbeitung der wichtigsten Prüfungsfakten ; [auf die Plätze los fertig]*. München: Elsevier Urban & Fischer (Klinik); 2004.
98. Matsushima KH. Transient forebrain ischemia protects against subsequent focal cerebral ischemia without changing cerebral perfusion. *Stroke*. 1995;26:1047-1052
99. Memezawa H, Zhao Q, Smith ML, Siesjo BK. Hyperthermia nullifies the ameliorating effect of dizocilpine maleate (mk-801) in focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 1995;670:48-52
100. Miller DL. Particle gathering and microstreaming near ultrasonically activated gas-filled micropores. *J Acoust Soc Am*. 1988;84:1378-1387
101. Molina C, Alvarez-Sabín J, Montaner J, Abilleira S, Arenillas J, Coscojuela P, Romero F, Codina A. Thrombolysis-related hemorrhagic infarction: A marker of early reperfusion, reduced infarct size, and improved outcome in patients with proximal middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2002;33:1551-1556
102. Molina C, Ribo M, Rubiera M, Montaner J, Santamarina E, Delgado-Mederos R, Arenillas J, Huertas R, Purroy F, Delgado P, Alvarez-Sabín J. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-mhz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2006;37:425-429
103. Mori E, Yoneda Y, Tabuchi M, Yoshida T, Ohkawa S, Ohsumi Y, Kitano K, Tsutsumi A, Yamadori A. Intravenous recombinant tissue plasminogen activator in acute carotid artery territory stroke. *Neurology*. 1992;42:976-982
104. Morimoto TG, Busto, R, Martinez, E, Ginsberg, MD. Simultaneous measurement of salicylate hydroxylation and glutamate release in the penumbral cortex following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:92-99

105. Muir KW, Grosset DG. Neuroprotection for acute stroke: Making clinical trials work. *Stroke*. 1999;30:180-182
106. Myers M. Transient temperature rise due to ultrasound absorption at a bone/soft-tissue interface. *J Acoust Soc Am*. 2004;115:2887-2891
107. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 1989;20:1037-1043
108. Nakagawa K, Ishibashi T, Matsushima M, Tanifuji Y, Amaki Y, Furuhashi H. Does long-term continuous transcranial doppler monitoring require a pause for safer use? *Cerebrovasc Dis*. 2007;24:27-34
109. Nathan CX-W. Nitric oxide synthases: Roles, tolls and controls. *Cell*. 1994;78:915-918
110. Nedelmann M, Eicke B, Lierke E, Heimann A, Kempfski O, Hopf H. Low-frequency ultrasound induces nonenzymatic thrombolysis in vitro. *J Ultrasound Med*. 2002;21(6):649-656
111. Nedelmann M, Eicke BM, Nolle F, Lierke EG, Kempfski O. The ultrasound contrast medium levovist increases the thrombolytic effect of low frequency ultrasound. 2002;97(4):216-220
112. Nedelmann M, Reuter P, Walberer M, Sommer C, Alessandri B, Schiel D, Ritschel N, Kempfski O, Kaps M, Mueller C, Bachmann G, Gerriets T. Detrimental effects of 60 khz sonothrombolysis in rats with middle cerebral artery occlusion. *Ultrasound Med Biol*. 2008;34:2019-2027
113. Nedelmann M, Ritschel N, Doenges S, Langheinrich A, Acker T, Reuter P, Yeniguen M, Pukropski J, Kaps M, Mueller C, Bachmann G, Gerriets T. Combined contrast enhanced ultrasound and rt-pa treatment is safe and improves impaired microcirculation after reperfusion of middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30:1712-1720
114. Nedelmann M, Wilhelm-Schwenkmezger T, Alessandri B, Heimann A, Schneider F, Eicke BM, Dieterich M, Kempfski O. Cerebral embolic ischemia in rats: Correlation of stroke severity and functional deficit as important outcome parameter. *Brain Res*. 2007;1130:188-196
115. Nickel RS, Seiferle, E. *Nervensystem in: Nickel, Schummer, Seiferle: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band iv: Nervensystem, Sinnesorgane, endokrine Ddrüsen* Stuttgart: Paul Parey; 1992.
116. Nishioka T, Luo H, Fishbein MC, Cercek B, Forrester JS, Kim CJ, Berglund H, Siegel RJ. Dissolution of thrombotic arterial occlusion by high intensity, low frequency ultrasound and dodecafluoropentane emulsion: An in vitro and in vivo study. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:561-568
117. Nolle F NM, Eicke BM, Kempfski O, Alessandri B, Dieterich M. Side effects of transcranial for thrombolysis used ultrasound: A rat model. *Cerebrovasc Dis* 2003;13 (suppl4)

118. Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, del Zoppo GJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1994;25:1847-1853; discussion 1853-1844
119. Oliff HS, Weber E, Eilon G, Marek P. The role of strain/vendor differences on the outcome of focal ischemia induced by intraluminal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res*. 1995;675:20
120. Padosch SV, Böttiger, BW. Neuronale apoptose nach zerebraler ischämie. *Anaesthesist*. 2001;50:905-920
121. Perren F, Loulidi J, Poglia D, Landis T, Sztajzel R. Microbubble potentiated transcranial duplex ultrasound enhances iv thrombolysis in acute stroke. *J Thromb Thrombolysis*. 2008;25:219-223
122. Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18:196-205
123. Poeck K, Hacke, W. *Neurologie*. Springer-Lehrbuch; 2006.
124. Pschyrembel WH, H. *Medizinisches Wörterbuch. Mit 268 Tabellen. Sonderausg. Pschyrembel klinisches Wörterbuch*. Hamburg: Nkol; 1994.
125. Quagliarello VJ, Wispelwey B, Long WJ, Scheld WM. Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest*. 1991;87:1360-1366
126. Rosenschein U, Furman V, Kerner E, Fabian I, Bernheim J, Eshel Y. Ultrasound imaging-guided noninvasive ultrasound thrombolysis: Preclinical results. *Circulation*. 2000;102:238-245
127. Roth H. Hochauflösende Analyse von Löt- und Schweißverbindungen mit Micro- und Nanoct®. *DACH-Jahrestagung, St.Gallen*. 2008;Poster 9
128. Sato PH. Tirilazad protects vitamins c and e in brain ischemia-reperfusion injury. *J Neurochem*. 1992;58:2263-2268
129. Schäberle W. *Ultraschall in der Gefäßdiagnostik. Therapieorientiertes Lehrbuch und Atlas ; mit 77 tabellen*. Berlin: Springer; 2004.
130. Schebitz H, Brass W. Operationen an Hund und Katze. 2007;3., unveränderte Auflage
131. Schellinger PD, Fiebach JB, Mohr A, Ringleb PA, Jansen O, Hacke W. Thrombolytic therapy for ischemic stroke--a review. Part ii--intra-arterial thrombolysis, vertebrobasilar stroke, phase iv trials, and stroke imaging. *Crit Care Med*. 2001;29:1819-1825
132. Schlosser H, Doepp F, Nolte C, Brock M, Schreiber S. Does routine transcranial duplex ultrasound heat up the patient brain? *Ultraschall Med*. 2009;30:37-41

133. Schneider F, Gerriets T, Walberer M, Mueller C, Rolke R, Eicke BM, Bohl J, Kempfski O, Kaps M, Bachmann G, Dieterich M, Nedelmann M. Brain edema and intracerebral necrosis caused by transcranial low-frequency 20-khz ultrasound: A safety study in rats. *Stroke*. 2006;37:1301-1306
134. Scremin O. *Cerebral vascular system*. Sydney, Australien: Academic Press; 1995.
135. Siddiqi F, Blinc A, Braaten J, Francis CW. Ultrasound increases flow through fibrin gels. *Thromb Haemost*. 1995;73:495-498
136. Siegel R, Atar, S, Fishbein, MC, Brasch, AV, Peterson, TM, Nagai, T, Pal, D, Nishioka, T, Chae, JS, Birnbaum, Y, Zanelli, C, Luo, H. Noninvasive, transthoracic, low-frequency ultrasound augments thrombolysis in a canine model of acute myocardial infarction. . *Circulation*. 2000;101:2026-2029
137. Siegel RJ, Cumberland DC, Myler RK, Belli A, DonMichael TA. Percutaneous peripheral ultrasonic angioplasty. *Herz*. 1990;15:329-334
138. Siesjö B. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part i: Pathophysiology. *J Neurosurg*. . 1992;77:169-184
139. Silbernagl SD, A. *Taschenatlas Physiologie*. Stuttgart: Thieme; 2007.
140. Silbernagl SL, F. *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Stuttgart, New York: Dt. Taschenbuch-Verl.; Thieme; 1998.
141. Skyscan. X-ray microtomography, x-ray naotomography, non-invasive 3d imaging, 2d/3d image analysis, small animal imaging.
142. Small D, Buchan, AM. . Animal models. *Br Med Bull*. 2000;56:307-317
143. Smith WS, Sung G, Starkman S, Saver JL, Kidwell CS, Gobin YP, Lutsep HL, Nesbit GM, Grobelny T, Rymer MM, Silverman IE, Higashida RT, Budzik RF, Marks MP. Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: Results of the merci trial. *Stroke*. 2005;36:1432-1438
144. Starritt HC, Hoad CL, Duck FA, Nassiri DK, Summers IR, Vennart W. Measurement of acoustic streaming using magnetic resonance. *Ultrasound Med Biol*. 2000;26:321-333
145. Statisches Bundesamt Wiesbaden. Statischeches Jahrbuch 2006.
146. Steffens J, Kalem T, Echte D. Endourologie. 2003
147. Stünzi HD, K; Frei, W. *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin. Mit 175 Abbildungen und 39 Tabellen*. Berlin: Parey; 1990.
148. Suchkova V, Baggs, RB, Francis, CW. Effect of 40-khz ultrasound on acute thrombotic ischemia in a rabbit femoral artery thrombosis model. *Circulation*. 2000;101:2296-2301
149. Tachibana K, Tachibana S. Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation*. 1995;92:1148-1150

150. Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG, Gibson DG, Fisher M. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (koizumi) in rats. *J Neurol Sci.* 1997;153:8-11
151. The NINDS-Sr-PSSG. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333:1581-1587
152. Thomalla G, Sobesky J, Köhrmann M, Fiebach J, Fiehler J, Zaro Weber O, Krutzelmann A, Kucinski T, Rosenkranz M, Röther J, Schellinger P. Two tales: Hemorrhagic transformation but not parenchymal hemorrhage after thrombolysis is related to severity and duration of ischemia: Mri study of acute stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator within 6 hours. *Stroke.* 2007;38:212-218
153. Todd N, Picozzi P, Crockard H, Russell R. Reperfusion after cerebral ischemia: Influence of duration of ischemia. *Stroke.* 1986;17:460-466
154. Töndury GK. *Gestalt und Gliederung des Gehirns.* Stuttgart, New York: George Thieme Verlag; 1987.
155. Töndury GK, Krisch, B. *Hirnhäute und Hirngefäße.* Stuttgart, New York: George Thieme Verlag 1987.
156. Toni D, De Michele M, Fiorelli M, Bastianello S, Camerlingo M, Sacchetti M, Argentino C, Fieschi C. Influence of hyperglycaemia on infarct size and clinical outcome of acute ischemic stroke patients with intracranial arterial occlusion. *J Neurol Sci.* 1994;123:129-133
157. Uno MM, Wallace, MC. Neutral red staining for assessment of acute outcome in rat focal ischemia models. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1995;35:561-566
158. Walberer M, Ritschel N, Nedelmann M, Volk K, Mueller C, Tschernatsch M, Stolz E, Blaes F, Bachmann G, Gerriets T. Aggravation of infarct formation by brain swelling in a large territorial stroke: A target for neuroprotection? *J Neurosurg.* 2008;109:287-293
159. Walker WFH, D G. *Anatomy & Dissection of the Rat.* New York, NY: Freeman (Freeman laboratory separates in biology); 1997.
160. Wallesch C-WA, H *Neurologie. [Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis] ; mit 327tabellen.* München: Elsevier Urban & Fischer; 2005.
161. Weiss J, Maeß J, Nebendahl K. *Haus- und Versuchstierpflege, 2.Auflage.* Stuttgart: Enke; 2003.
162. Wilhelm-Schwenkmezger T, Pittermann P, Zajonz K, Kempfski O, Dieterich M, Nedelmann M. Therapeutic application of 20-khz transcranial ultrasound in an embolic middle cerebral artery occlusion model in rats: Safety concerns. *Stroke.* 2007;38:1031-1035
163. Wolf PA, Cobb J. L., D'Agostino R. B. . Epidemiology of stroke. *Stroke.* 1992;3:27

164. Wunderlich MT, Goertler M, Postert T, Schmitt E, Seidel G, Gahn G, Samii C, Stolz E. Recanalization after intravenous thrombolysis: Does a recanalization time window exist? *Neurology*. 2007;68:1364-1368
165. www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/nmr_spek/anwendung_nmr.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/nmr_spek/m_53/nmr_11_4/nmr_11_4_1/anwnmr_rtrgr_m53te0204.vscml.html.
166. Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H, Schmid-Elsaesser R. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: A comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res*. 2000;863:94-105
167. Zhao Q, Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK. Hyperthermia complicates middle cerebral artery occlusion induced by an intraluminal filament. *Brain Res*. 1994;649:253-259

XI. Anhang

11.1. Publikationen

Walberer M, Ritschel N, Nedelmann M, Volk K, Mueller C, Tschernatsch M, Stolz E, Blaes F, Bachmann G, Gerriets T. Aggravation of infarct formation by brain swelling in a large territorial stroke: a target for neuroprotection? *J Neurosurg.* 2008 Aug;109(2):287-93.

Nedelmann M, Reuter P, Walberer M, Sommer C, Alessandri B, Schiel D, Ritschel N, Kempfski O, Kaps M, Mueller C, Bachmann G, Gerriets T. Detrimental effects of 60 kHz sonothrombolysis in rats with middle cerebral artery occlusion. *Ultrasound Med Biol.* 2008 Dec;34(12):2019-27.

Walberer M, Tschernatsch M, Fischer S, Ritschel N, Volk K, Friedrich C, Bachmann G, Mueller C, Kaps M, Nedelmann M, Blaes F, Preissner KT, Gerriets T. RNase therapy assessed by magnetic resonance imaging reduces cerebral edema and infarction size in acute stroke. *Curr Neurovasc Res.* 2009 Feb;6(1):12-9.

Gerriets T, Walberer M, Ritschel N, Tschernatsch M, Mueller C, Bachmann G, Schoenburg M, Kaps M, Nedelmann M. Edema formation in the hyperacute phase of ischemic stroke. Laboratory investigation. *J Neurosurg.* 2009 Nov;111(5):1036-42.

Walberer M, Nedelmann M, Ritschel N, Mueller C, Tschernatsch M, Stolz E, Bachmann G, Blaes F, Gerriets T. Intravenous immunoglobulin reduces infarct

volume but not edema formation in acute stroke. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(2):97-102.

Gerriets T, Walberer M, Nedelmann M, Doenges S, Ritschel N, Bachmann G, Stolz E, Kaps M, Urbanek S, Urbanek P, Schoenburg M. A rat model for cerebral air microembolisation. *J Neurosci Methods*. 2010 Jun 30;190(1):10-3.

Nedelmann M, Ritschel N, Doenges S, Langheinrich AC, Acker T, Reuter P, Yeniguen M, Pukropski J, Kaps M, Mueller C, Bachmann G, Gerriets T. Combined contrast-enhanced ultrasound and rt-PA treatment is safe and improves impaired microcirculation after reperfusion of middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 Oct; 30(10):1712-20

11.2. Danksagung

Ich danke allen sehr herzlich, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere:

Prof. Dr. Georg Bachmann für die Möglichkeit diese Promotion an der Kerckhoff-Klinik durchzuführen

Prof. Dr. Manfred Kaps, der mir diese Promotion seitens des Universitätsklinikums ermöglicht hat

Prof. Dr. J. Roth für die spontane Bereitschaft, die Arbeit von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität zu betreuen und für die Begutachtung dieser Dissertation

Prof. Dr. Max Nedelmann für die Überlassung des Themas, für die herzliche und unkomplizierte Betreuung und zahlreichen Diskussionen während der gesamten 2 Jahre.

Prof. Dr. Tibo Gerriets für die herzliche und unkomplizierte Betreuung während der gesamten 2 Jahre, sowie für die vielen konstruktiven Anregungen

Dr. Clemens Müller für die humorvolle Hilfestellung bei den technischen Problemen am MRT

Dr. Maureen Walberer für ihre gute Einarbeitung in die experimentelle Methodik und die fernmündliche Hilfestellung

Dr. Peter Reuter und meiner Kollegin Tierärztin Simone Doenges für viele schöne und arbeitsreiche Stunden und den ständigen Kuchennachschub

Den vielen anderen Kollegen, die meine Arbeitstage so angenehm gestaltet haben, besonders Dr. Astrid Wietelmann und Ursula Hofmann die mit zahlreichen Süßigkeiten die Messzeiten sehr kurzweilig gestaltet haben

Der Kerckhoff-Klinik GmbH und dem Universitätsklinikum Giessen und Marburg für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Erstellung dieser Doktorarbeit

Dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung für die Möglichkeit den Tierstall zu nutzen und die wunderbare Betreuung der Versuchstiere

Meinen wundervollen Eltern für die Selbstverständlichkeit ihrer fürsorglichen Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung

Meinem liebsten Michael für seine unendliche Geduld und Hilfestellung bei diversen Computerproblemen und seine liebevolle Unterstützung während der letzten Jahre

11.3. Erklärung

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

ISBN 978-3-86345-057-1



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.de>**