

**Mikro- und Nano- Computertomographie zur ex-vivo Evaluation von
Neoangiogenese nach Sinusthrombose am Tiermodell**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus - Liebig - Universität Gießen

vorgelegt von Mesut Yenigün, geb. in Nusaybin

Gießen 2012

Aus der Neurologischen Klinik

Der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. M. Kaps

Gutachter: Prof. Dr. E. Stolz

Gutachter: Frau Prof. Dr. G.A. Krombach

Tag der Disputation: 25.04.2013

Gewidmet Leyla, Rasha und meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1	Sinus- und Hirnvenenthrombosen	1
1.1.1	Inzidenz	1
1.1.2	Ätiologie	1
1.1.3	Klinik	2
1.1.4	Diagnostik	4
1.1.5	Therapie	6
1.1.6	Prognose	8
1.2	Prinzipien der Bildgebung	9
1.2.1	Mikro-Computertomographie	9
1.2.2	Synchrotronbasierte Mikro-CT	12
1.2.3	Nano-Computertomographie	13
1.3	Tiermodelle der Sinus und Hirnvenenthrombose und Thromboseinduktion	14
1.4	Angiogenese	15
1.5	Ziel der Arbeit und Fragestellung	17
2.	Material und Methoden	18
2.1.	Tierversuchsantrag	18

2.2	Versuchstiere und Tierhaltung	18
2.3	Narkose	18
2.4	Versuchsgruppeneinteilung	19
2.5	Sinus sagittalis superior Thrombose	19
2.6	Post mortem Präparation	20
2.7	Mikro-Computertomographie	22
2.8	Mikro-Computertomographie mit Synchrotronstrahlung	23
2.9	Nano- Computertomographie	24
2.10	Histologische Aufarbeitung	24
2.11	Quantitative Reverse Transkriptions– Polymerase Kettenreaktion	24
2.12	Statistik	25
2.13	Neurologische Beurteilung der Tiere	25
	2.13.1 Rotarod-Test	25
	2.13.2 Neurologischer Defizit Score	26
3.	Ergebnisse	28
3.1	Ergebnisse der 1. Untersuchung	28
	3.1.1 Mikro-CT	28
3.2	Ergebnisse der 2. Untersuchung	33
	3.2.1 Mikro-Computertomographie	33
	3.2.2 Nano-Computertomographie	34
	3.2.3 Synchrotron-basierte Mikro-Computertomographie	36
	3.2.4 Histologie	37
	3.2.5 Rotarod-Test	39
	3.2.6 Neurologischer Defizit Score	39

4.	Diskussion	39
4.1	Klinisches Krankheitsbild	39
4.2	Pathophysiologie	41
4.3	Tiermodelle zur Sinusthrombose	42
4.3.1	Modifikation des SSS Thrombosemodells	43
4.4	Mikro- und Nano- Computertomographie	44
4.4.1	Mikro- und Nano- CT im Sinusthrombosemodell	46
4.5	Angiogenese	47
4.6	Methodische Limitationen der vorliegenden Untersuchung	50
5.	Summary	51
6.	Literaturverzeichnis	53
7.	Danksagung	68
8.	Lebenslauf	69
9.	Anlage	71
9.1	Publikationen	71
9.3	Posterbeiträge	73
10.	Abkürzungsverzeichnis	75

1. EINLEITUNG

1.1 Sinus- und Hirnvenenthrombosen

1.1.1 Inzidenz

Die vermutete jährliche Inzidenz der Sinus- und Hirnvenenthrombose (SHVT) liegt bei Erwachsenen bei etwa 3-4/ 1 Million, bei Kindern mit etwa 7/1 Million etwas höher (Stam 2005). Die SHVT gilt im breiten Spektrum zerebrovaskulärer Erkrankungen als eine eher seltenere Erkrankung und ist vermutlich für etwa 1 % aller Schlaganfälle verantwortlich (Stam 2005). SHVT sind aufgrund ihrer heterogenen klinischen Manifestationsformen jedoch sicher deutlich unterdiagnostiziert (Bousser & Ferro 2007, Einhüpl et al. 2010). In Patientenkollektiven mit entweder zunehmendem Kopfschmerz ohne Kopfschmerzanamnese oder Kopfschmerzen in Verbindung mit neurologischen Störungen, epileptischen Anfällen oder Bewusstseinsstörung ist mit einer Häufigkeit der SHVT von etwa 10% zu rechnen (Kosinski et al. 2004 und Tanislav et al. 2011)

1.1.2 Ätiologie

In den letzten Jahren wurden zahlreiche gesicherte Ursachen oder prädisponierende Risikofaktoren für die SHVT identifiziert (Ferro et al. 2004, Ferro et al. 2005, Lanska & Kryscio 2000, Stam 2003). Vergleichbar mit Thrombosen tiefer Bein- und Beckenvenen infolge bekannter allgemeiner Faktoren wie Infektionen, Koagulopathien, Dehydratation etc. spielen auch andere lokale Ursachen wie beispielsweise Schädelhirntraumata, Arachnoidalzysten oder Gefäßmalformationen für die SHVT eine Rolle. Den häufigsten Risikofaktor stellt allerdings die orale

Kontrazeption in 50 – 80% der weiblichen Fälle dar – hier insbesondere Gesto- oder Desogestrelhaltige Präparate- gefolgt von angeborenen oder erworbenen thrombophilen Gerinnungsstörungen in ca. 30% (Dentali et al. 2006, Stolz et al. 2000, de Bruijn et al. 1998, Herings, Urquhart & Leufkens 1999, Martinelli et al. 1998) und der Partal- und Postpartalphase in ca. 20% der Erkrankungen. Während noch bis in die 50er Jahre hinein infektiöse Ursachen wie Otitis, Mastoiditis, Folliculitis etc. häufigste Risikofaktoren der SHVT waren (Kalbag 1967), sind diese im Zeitalter der antibiotischen Therapiemöglichkeiten mittlerweile weitgehend in den Hintergrund gerückt.

Mehrere Gruppen fanden in den letzten Jahren angeborene und erworbene thrombophile Gerinnungsstörungen als Ursache einer SHVT (Ferro et al. 2004, Stam 2005, de Freitas & Bogousslavsky 2008). Ein sicherer Zusammenhang besteht für die Faktor V Leiden Mutation und den Prothrombin $G_{20210} \rightarrow A$ Polymorphismus (Martinelli et al. 1996, Ventura et al. 2004, Gadelha et al. 2005, Weih et al. 1998). Gesichert erscheint ebenfalls ein Zusammenhang mit einer Hyperhomocysteinämie (Martinelli et al. 2003, Ventura et al. 2004, Cantu & Barinagarrementeria 2004), während ein erhöhtes Lipoprotein(a) bisher nur für pädiatrische Patienten als Risikofaktor nachgewiesen wurde. In Fallserien kann bei etwa 7 - 8% der Patienten ein Lupus anticoagulans identifiziert werden (Kearon et al. 1999). Die Vielzahl potenzieller Ursachen weist daraufhin, dass die Mehrzahl der SHVT multifaktoriell bedingt sind. Unter dem Aspekt der oftmals unsicheren diagnostischen Wertigkeit vieler prädisponierender Faktoren ist es nicht ausgeschlossen, dass die Ursache einer SHVT in 15-35% der Fälle ungeklärt bleibt (Bousser 2007).

1.1.3 Klinik

Mit etwa 90% geht der Kopfschmerz als das häufigste, allerdings auch als das unspezifischste Symptom hervor, oft auch als das erste (>70%), nicht selten auch als das einzige Symptom (Ferro et al. 2004, Bousser et al. 1985, Breteau et al. 2003, de Bruijn et al. 2001, Cumurciuc et al. 2005, Crassard & Bousser 2005). Üblicherweise treten dabei auch andere Symptome einer intrakraniellen Druckerhöhung auf wie Übelkeit, Erbrechen und Sehstörungen (Cumurciuc et al. 2005). In den meisten Fällen treten die Kopfschmerzen subakut auf. Bei perakuten Kopfschmerzen muss

differentiadiagnostisch eine Subarachnoidalblutung bedacht und ausgeschlossen werden (de Bruijn, Stam & Kappelle 1996, Cumurciuc et al. 2005). Immerhin weisen ca. 10 – 20% der Patienten einen Meningismus auf. Eine subarachnoidale Blutung lässt sich tatsächlich aber nur sehr selten feststellen. Röttger et al. konnten beispielsweise 2004 beobachten, dass Patienten nach einer Niesattacke bzw. einem Sprung von einem ca. 1 m hohen Felsen einen schlagartigen Kopfschmerz entwickelten, dem eine SHVT zu Grunde lag. Die intrakraniellen Sinus sind dicht von Schmerzfasern innerviert (Knyihar-Csillik et al. 2001), was vermuten lässt, dass eine Endothelverletzung des Sinus durch plötzlich steigenden intrakraniellen Druck bzw. ein Beschleunigungstrauma der Sinuswand für den starken akut auftretenden Kopfschmerz ursächlich ist. Zu den häufigen Symptomen einer SHVT zählen ebenfalls fokale-neurologische Ausfälle in Form einer Hemi- oder Tetraparese, halbseitigen Sensibilitätsstörungen oder Koordinationsstörungen bei v.a. Thrombosen der kortikalen Venen (Masuhr, Mehraein & Einhüpl 2004, Stam 2005). Etwa gleich häufig treten fokale oder sekundär generalisierte epileptische Anfälle auf. Eine Bewusstseinsstörung weist etwa ein Drittel der Patienten auf. Eine Stauungspapille wird nur bei deutlich weniger als der Hälfte der Patienten beobachtet (Stam 2005). Insgesamt bietet die SHVT symptomatisch ein sehr komplexes Bild, das von der Lokalisation der stark variablen zerebralen Venenthrombose bzw. der hierdurch hervorgerufenen zerebralen Läsionen wie eventueller Stauungsinfarkte sowie der kollateralen Drainage abhängt.

Die Symptomatik kann akut oder protrahiert über Tage und Wochen beginnen, so dass in vielen Fällen der tatsächliche Zeitpunkt des Auftretens der Thrombose unklar ist. Besondere Formen der SHVT stellen die isolierte intrakranielle Hypertension mit beidseitigen Stauungspapillen und Kopfschmerzen und die Sinus cavernosus Thrombose mit Chemose, Protrusio bulbi, Papillenödem, schmerzhafter Ophthalmoplegie und ggf. trigeminalen Sensibilitätsstörungen dar (Biousse, Ameri & Bousser 1999, Herrmann, Sporer & Yousry 2004). Periphere Hirnnervenausfälle können bei Thromben in den Sinus transversus oder sigmoideus (N. III – VIII), den Sinus petrosus superior (N. V) und inferior (N. VI) oder die V. jugularis interna (N. IX – XII) vorkommen (Kuehnen et al. 1998). Eine bilaterale Thrombose der inneren Hirnvenen (Vv. Cerebri internae), die insbesondere zu Schädigungen an Thalami und Basalganglien führt, verursacht Bewusstseinstörungen und leichte frontotemporale Hirnfunktionsstörungen sowie Verhaltensstörungen, amnestische Störungen, Hemi-

oder Tetraparesen, supranukleärer Okulomotorikstörungen (Herrmann, Sporer & Yousry 2004, Bousser & Russell 1997). Infauste Verläufe mit Herniation bzw. Einklemmung kommen infolge großer Einblutungen oder massiver Ödembildung vor. Aufgrund der Thrombosierung auf der einen und der gleichzeitigen endogenen Fibrinolyse auf der anderen Seite ist der Verlauf der Symptomatik oft fluktuierend (Masuhr, Mehraein & Einhäupl 2004, Urban & Müller-Forell 2005).

1.1.4 Diagnostik

Aufgrund eines im Gegensatz zu arteriellen Verschlüssen fehlenden gut definierten, topographisch-klinischen Syndroms, eines charakteristischen, ausschließlich für die SHVT typischen Symptoms muss bei klinischem Verdacht eine bildgebende Diagnostik erfolgen. Bisher fehlen Untersuchungen, die prädiktive Faktoren für das Vorliegen einer SHVT bei symptomatischen Patienten definieren konnten. Bisher durchgeführte Bestimmung von D-Dimeren bei SHVT zeigten Raten von ca. 9-10 % falsch positiver und 3-26 % falsch negativer Ergebnisse und lassen die D-Dimerbestimmung als diagnostisch ungeeignet erscheinen (Crassard et al. 2005, Lalive et al. 2003, Kosinski et al. 2004, Tanislav et al. 2011). Untersuchungen des Liquor cerebrospinalis zeigten ebenso geringe Spezifität (Bousser et al. 1985).

Die kraniale Computertomographie (CCT) als schnelle, breit verfügbare und nichtinvasive Methode stellt bei Patienten mit akuten neurologischen Defiziten bzw. unklaren neurologischen Symptomen in der Regel die am häufigsten primär eingesetzte bildgebende Diagnostik dar. In etwa 30 – 50% der Fälle ergeben sich bei SHVT bereits hier Befunde eines nicht hämorrhagischen, in ca. 30% der Fälle eines hämorrhagischen Hirninfarkts. Neben der klinischen Konstellation wecken diese Befunde insbesondere dann den Verdacht auf eine SHVT, wenn sie sich nicht an ein Versorgungsareal einer Hirnarterie halten. Die Sensitivität ist als insgesamt gering einzustufen (Bousser et al. 1985, Schwarz 2003). Zahlreiche Differentialdiagnosen wie atypische Blutung bei Amyloidangiopathie oder arteriovenöser Malformation, Tumorblutung, hämorrhagische Enzephalitis, septische Herdenzephalitis etc. lassen sich mit einer CCT nicht genauer klären. Durch multiplanare Rekonstruktionen der Quellenbilder kann die Thrombose analysiert und dargestellt werden. Ein bithalamisches Hirnödem kann auf eine innere Hirnvenenthrombose hindeuten (Bousser

2000). Einen weiteren unspezifischen Befund im nativen CCT stellen Schlitzventrikel bei Pseudotumor cerebri dar. Auch das generalisierte Hirnödem oder eine Mittellinienverlagerung in Folge eines raumfordernden Hirnödems sind unspezifische Befunde (Stam 2005, Bousser 2000).

Das erst nach Kontrastmittelgabe sichtbare „leere Dreieckszeichen“ (Empty Delta oder Triangular Sign) ist für eine Thrombose im hinteren Drittel des Sinus sagittalis superior spezifisch und besteht in einer Kontrastmittelaussparung im Zentrum des Sinus durch den Thrombus und einer Kontrastmittelanreicherung der Sinuswand. Es ist allerdings nur in ca. 30% der Fälle vorhanden (Bousser & Russell 1997, Lee 2004, Virapongse et al. 1987) und kann innerhalb der ersten 5 Tage und nach Monaten negativ sein (Shinohara, Yoshitoshi & Yoshii 1986).

Im direkten Vergleich mit der digitalen Subtraktionsangiographie (DSA) können die großen venösen Blutleiter mit einer ebenso hohen Sensitivität und Spezifität mittels CT-Angiographie(CTA) abgebildet werden. Die Darstellbarkeit der kortikalen Venen, der septalen und thalamostriatalen Venen liegt unter der der DSA, während der Sinus cavernosus besser mit der CTA untersucht werden kann (Kaminogo et al. 2001, Wetzel et al. 1999). Die thrombosierten Gefäßareale kommen mittels kontrastmittelgestützter CTA mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung durch segmentale Aussparungen zur Darstellung (Linn et al. 2007, Wetzel et al. 1999). Der Vorteil der venösen CTA liegt in der kurzen Messzeit (ca. 1 min), so dass auch unruhige Patienten untersucht werden können. Hier ergeben sich im Vergleich zur MR-Angiographie auch weniger Flussartefakte. Probleme können bei der zeitgerechten Bilderfassung auftreten, da die Passage eines Kontrastmittelbolus bis in das venöse System abgepasst werden muss. Eine ungenügende Knochenunterdrückung kann zu Artefakten führen (Renowden 2004, Rodallec et al. 2006). Klinische Kontraindikationen bestehen in einer bekannten Allergie auf jodhaltige Kontrastmittel und bei Niereninsuffizienz.

Mittlerweile hat sich die Magnetresonanztomographie (MRT) in Verbindung mit einer venösen MR-Angiographie als diagnostische Methode der Wahl durchgesetzt. Mittels MRT können sowohl der Thrombus als auch gleichzeitig Parenchymveränderungen visualisiert werden(Lettau et al. 2009, Lettau et al. 2011). Eine Strahlenbelastung ist hier nicht gegeben. Im klinischen Alltag kommen T1-, T2 und protonengewichtete

Spin-Echo-Sequenzen (T1w SE, T2wSE, PDw), FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) sowie verschiedene MR-Angiographie Techniken bei der Frage nach einer SHVT zum Einsatz (Macchi et al. 1986, Leach et al. 2006, Farb et al. 2003). Mit zunehmender Häufigkeit kommt in den letzten Jahren der T2*- gewichteten Gradientenecho-Sequenz (T2*w GRE) eine große Rolle zu, da diese die Fähigkeit zur Darstellung der paramagnetischen Abbauprodukte von Hämoglobin (Desoxyhämoglobin und Methämoglobin) aufweist und sich daher zur Darstellung intraluminaler Thromben und einer zeitlichen Abschätzung des Alters derselben eignet (Leach et al. 2006, Selim et al. 2002, Fellner et al. 2005, Idbaih et al. 2006, Leach, Wolujewicz & Strub 2007). Die Diagnose einer isolierten Kortexvenenthrombose ist nur sicher mit der DSA möglich. Auch für die genaue Beurteilung venöser Kollateralen ist meist eine konventionelle Angiographie notwendig.

Die DSA spielt heute bei der Diagnostik der SHVT praktisch nur noch eine untergeordnete Rolle und stellt eine allenfalls ergänzende Untersuchung bei fehlenden Schnittbildverfahren dar. Für die sichere Diagnose einer SHVT ist im Klinikalltag u.U. die Kombination mehrerer der beschriebenen Möglichkeiten notwendig (Leach et al. 2006).

1.1.5 Therapie

Die intravenöse Behandlung mit unfraktioniertem Heparin mit einer 2 – 2,5-fach verlängerten PTT als Standardtherapie in der Akutphase der SHVT hat Eingang in die aktuellen Therapieleitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie gefunden (Haberl 2008, www.dgn.org). Diese Einschätzung geht auf eine doppelblinde, plazebokontrollierte Studie von Einhüpl und Mitarbeitern (1991) mit jeweils 10 Patienten pro Studienarm zurück. Patienten, die eine PTT-wirksame Heparinisierung erhielten, zeigten eine signifikante klinische Besserung nach 3, 8 und 21 Tagen gegenüber Plazebo. Eine holländische doppelblinde, plazebokontrollierte Studie mit niedermolekularem Heparin (Nadroparin 180 Anti-Faktor Xa Einheiten/kg und pro 24 h subkutan) für 3 Wochen gefolgt von einer oralen Antikoagulation für 3 Monate (n = 29) versus Placebo (n = 30) konnte keine signifikante Überlegenheit einer Heparinisierung in der Akutphase der Erkrankung zeigen (de Bruijn & Stam 1999). Nach 12 Wochen zeigten zwar Patienten im Nadroparin-Arm eine relative

Risikoreduktion von 7% für starke Behinderung und Tod (Oxford Handicap Scale \geq 3), jedoch erwies sich auch dieser Unterschied nicht als signifikant. In letzter Zeit mehren sich Berichte über eine endovaskuläre lokale Thrombolyse, mechanischer Zerteilung des Thrombus sowie Retraktion desselben (Stam et al. 2008). Bisher finden sich in der Literatur einzelne Fallberichte und kleinere Fallserien mit maximal 20 Patienten (Stam et al. 2008), die einer Thrombolyse mit Urokinase oder rt-PA unterzogen wurden (Canhão, Falcão & Ferro 2003, Horowitz et al. 1995, Kim & Suh 1997, Frey et al. 1999, Stam et al. 2008, Wasay et al. 2001). Ein retrospektiver Vergleich von jeweils 20 Patienten mit Sinus sagittalis superior Thrombose mit vergleichbarem Defizit vor Therapiebeginn, die entweder intravenös Heparin oder lokal Urokinase erhielten, ergab ein signifikant geringeres funktionelles Defizit bei Krankenhausentlassung in der Lysegruppe (Wasay et al. 2001). Eine prospektive Studie mit einer Patientenzahl von 20 zur endovaskulären Thrombektomie und Thrombolyse bei schweren SHVT zeigte stark schwankende Angaben hinsichtlich Blutungskomplikationen, Mortalität und günstigem Outcome. Während Thrombolyse bei schweren Sinusthrombosen eine hohe Effektivität zeigte, bei jedoch steigendem Risiko für hämorrhagische Komplikationen, profitierten Patienten mit großem Infarkt und bevorstehender Herniation nicht (Stam et al. 2008). Da die überwiegende Mehrzahl der Patienten einen guten Langzeitverlauf aufweist kommt für eine thrombolytische Therapie allenfalls eine Subgruppe von Patienten mit einem hohen Risiko einer bleibenden Behinderung in Frage. Nach Untersuchungen von Stolz et al. 2005 und Canhao et al. 2005 stellt das therapierefraktäre Hirnödem mit konsekutiver transtentorieller Herniation die häufigste Ursache für den Tod in der Akutphase der Erkrankung dar. Therapieoptionen stellen Osmotherapeutika, Acetazolamid oder eine Beatmung mit kontrollierter Hyperventilation dar. Steroide sind durch ihren thrombophilen Effekt umstritten. Für keine dieser Therapiemaßnahmen liegt eine Evidenz in Form von kontrollierten Studien vor. In Einzelfällen mit lokalisiertem raumforderndem Ödem kommt zur Druckentlastung eine dekompressive Kraniektomie in Frage (Keller et al. 2005, Stefini et al. 1999, Lanterna et al. 2009, Coutinho et al. 2009, Ferro et al. 2011). Bei isolierter intrakranieller Hypertension, insbesondere bei Beeinträchtigung der Sehfähigkeit wird die Senkung des intrakraniellen Drucks durch Lumbalpunktion vor Einleitung der Antikoagulation empfohlen (Bousser 2000).

Epileptische Anfälle sind häufiges Erstsymptom der SHVT. Aussagekräftige Daten über den Nutzen von prophylaktisch verabreichten antiepileptischen Medikamenten fehlen. Einzelne Empfehlungen, prophylaktische Antikonvulsiva zu geben, werden mit der hohen Inzidenz von Krampfanfällen oder sogar Status epilepticus erklärt (Masuhr et al. 2006), diese Empfehlungen wurden jedoch verworfen. Allgemein wird empfohlen, auch erstmalige symptomatische Anfälle antiepileptisch zu behandeln (Ferro et al. 2008). In unserem eigenen Patientengut waren rezidivierende Anfälle trotz antiepileptischer Einstellung signifikant mit einer schlechteren Langzeitprognose vergesellschaftet (Stolz et al. 2005b). Bei septischen SHVT sind über die oben genannten Maßnahmen hinaus eine chirurgische Sanierung des Fokus und eine sofortige antibiotische Therapie notwendig. Mangels entsprechender Studien orientiert sich die Dauer der oralen Antikoagulation weitgehend an der Situation bei tiefen Beinvenenthrombosen. In der Literatur werden Zeiträume von 3 bis 12 Monaten empfohlen (Masuhr & Einhäupl 2008, Masuhr, Mehraein & Einhäupl 2004, Schwarz 2003, Bousser 2000, Kearon et al. 2008, Lijfering et al. 2009, Coutinho et al. 2010).

1.1.6 Prognose

Die Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass die SHVT eine deutlich bessere Prognose besitzt, als lange Zeit angenommen wurde (Ferro et al. 2004, Preter et al. 1996, de Bruijn, De Haan & Stam 2001, Ferro et al. 2002, Breteau et al. 2003, Cakmak et al. 2003). Sofern die Akutphase der Erkrankung überlebt wird, verbleiben etwa 70% der Patienten ohne wesentliche Behinderung. Als zuverlässigste Daten gelten jene aus der prospektiven International Study on Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis (ISCVT) von 624 Patienten mit gesicherter SHVT zwischen 1998 und 2002. Diese ergab eine Gesamtsterblichkeit von 8,3% (Ferro et al. 2004), keine oder nur minimale Residuen bei 79,1 %, leichte bis mittelgradige Residuen bei 10,4 %, und 2,2% mit schweren Behinderungen. Eine ungünstige Prognose war mit höherem Lebensalter, männlichem Geschlecht, Stauungsblutung, Thrombose der inneren Hirnvenen und des rechten Sinus transversus, ZNS-Infektion und Neoplasmen assoziiert (Ferro et al. 2004, Girot et al. 2007). In der ISCVT hatten 57% nach 6 Monaten keinerlei Beschwerden mehr.

Die Verteilung des Grads der Behinderung unterscheidet sich dabei grundsätzlich vom arteriellen Hirninfarkt. In verschiedenen Studien wurden unabhängige Prädiktoren für schwere Behinderung und Tod isoliert. Offensichtlich besitzt die Bewusstseinsstörung bei Aufnahme in der Mehrzahl der Studien einen prädiktiven Wert. Dieses Symptom ist leicht zu erheben und könnte die Patienten identifizieren, die von einer invasiveren Therapie, z.B. der lokalen Thrombolyse, auch bei erhöhtem Risiko von Nebenwirkungen profitieren könnten (Stam et al. 2008). In zwei Studien wurden bei etwa einem Drittel der Patienten bei systematischer neuropsychologischer Testung nach 1 bzw. im Mittel 3,5 Jahren kognitive Defizite festgestellt (de Bruijn et al. 2000, Buccino et al. 2003). Während de Bruijn und Mitarbeiter einen Einfluss kognitiver Störungen auf die Aktivitäten des täglichen Lebens feststellten, war dies in der Untersuchung von Buccino und Mitarbeitern nicht der Fall, so dass die tatsächliche Bedeutung kognitiver Beeinträchtigungen nach SHVT derzeit noch offen ist. In der Untersuchung von Stolz et al. waren von 79 Patienten lediglich 2 durch Gedächtnisstörungen soweit behindert, dass sie ihren früheren Beruf nicht mehr ausüben konnten. In etwa 10 - 20% der Fälle entwickelt sich als Langzeitkomplikation der SHVT eine Epilepsie. In ähnlicher Häufigkeit kommt es im Verlauf zu extrazerebralen Venenthrombosen, während SHVT Rezidive nur in 2 – 3% der Fälle beobachtet werden. In etwa 2 – 3% der Patienten entwickelt sich im Verlauf eine leptomeningeale Fistel, die selbst wiederum einen Risikofaktor für eine SHVT darstellt.

1.2. Prinzipien der Bildgebung

1.2.1 Mikro-Computertomographie

In der Diagnostik kardiovaskulärer und zerebraler Erkrankungen werden verschiedene bildgebende Techniken wie MRT, MR-Angiographie, Mehrzeilen-CT, digitale Subtraktionsangiographie und intravaskulärer Ultraschall angewandt. Im Laufe der letzten Jahre machten diese Techniken Fortschritte in der Gefäßdarstellung, die räumliche Auflösung klinisch einsetzbarer und in der Grundlagenforschung etablierter Geräte konnte jedoch kaum eine Größenordnung

von <500 µm erreichen (Beckmann 2000, Bernstein et al. 2001, Buecker et al. 2002, Kuehne et al. 2002, Meyer et al. 2000, Spuentrup et al. 2003, von Birgelen et al. 1997, Nissen & Yock 2001, Costa et al. 2000, Achenbach 2003, Goyen et al. 2003). Prä- und postkapilläre Blutgefäße oder feine Weichteildetails lassen sich mit diesen Verfahren kaum erfassen, weshalb bis dato die histologische Aufarbeitung weiterhin einen Goldstandard bei Untersuchungen von Strukturen in einer Größenordnung unter 200 µm darstellt. Heute erzielt man bei der CT kürzere Scanzeiten und eine Reduktion der Strahlenbelastung. Hochauflösende Spiral-CT Scanner erreichen eine Ortsauflösung von isotropen Voxeln von 0,6 x 0,6 x 0,6 mm. Durch die intravaskuläre Sonographie kann eine arteriosklerotische Läsion, deren Lipidgehalt, der Fibrosierungs- und Verkalkungsgrad sowie der Schweregrad der Erkrankung in ihrer Gesamtheit abgeschätzt werden. Die intraarterielle Angiographie zeigt eine Abbildung des Gefäßlumens, weitere detaillierte Strukturen der Gefäßwand werden jedoch nicht abgebildet. Einen Goldstandard zur Darstellung und quantitativen Auswertung kleiner Strukturen in einer Größenordnung von <200 µm stellt die standardisierte Histomorphometrie dar. Die histologische Untersuchung wird in der Routinediagnostik zur Darstellung der Wanddicke, Lumenweite, endothelialer Oberfläche, Stenosegrad und Plaquerfläche herangezogen, birgt aber aufgrund des nur wenige Mikrometer großen Untersuchungsmaterials die Gefahr, dass die Kontinuität und eventuelle Heterogenitäten stenosierender Läsionen kaum zuverlässig erfasst werden (Grewe et al. 2000, Galloni et al. 2003). Durch Interpolation wird auf die Dimension des gesamten Gefäßes oder eines bestimmten Gefäßabschnitts rückgeschlossen. Die Nachteile dieses Verfahrens liegen in der zeit- und personalintensiven Probenaufbereitung und in einer nur 2-dimensionalen Gefäß- und Weichteildarstellung.

Die Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) hat sich in der letzten Dekade als eine neue Methode und neben der altbewährten quantitativen Histologie als potentielle Alternative in der ex-vivo Forschung etabliert (Jorgensen, Demirkaya & Ritman 1998, Ritman, Jorgensen & Lund 1997, Wan et al. 2000, Wang 2002). Diese Methodik zielte auf eine bessere Auflösung der bildgebenden Verfahren um damit eine detaillierte Strukturanalyse eines kleinen Untersuchungsobjektes durchzuführen. Zahlreiche Untersuchungen konnten in den letzten Jahren auf dem Gebiet der vaskulären Grundlagenforschung vorgenommen werden und durch die Anwendung intravasaler Kontrastmittel, die sich teilweise im Gefäßlumen verfestigen,

Gefäßalterationen mit großer Genauigkeit dargestellt und quantifiziert werden ohne diese Proben zu zerstören (Simopoulos et al. 2001, Maehara 2003, Bentley et al. 2002, Rodriguez-Porcel et al. 2000, Langheinrich et al. 2004, 2007, 2010, Moritz et al. 2010). Aufgrund der gewebeerhaltenden Methode kann das Präparat nach dem Scannen weiteren radiologischen, histologischen oder immunhistochemischen Untersuchungen unterzogen werden. Bei dem von uns verwendeten Mikro-CT handelt es sich um ein Gerät mit Kegelstrahlgeometrie und einer Mikrofokusröntgenröhre mit einer Fokusgröße von 8 μm von der Firma SkyScan (SkyScan1027_80kV, Aartselaar, Belgien). Es besteht aus einem Scanner, der in ein röntgendichtes Gehäuse eingebettet ist, sowie aus zwei PC-Einheiten für die Gerätesteuerung und Bildrekonstruktion. Im Scanner befindet sich eine Vorrichtung für die Proben zwischen der Mikrofokusröntgenröhre und einem Charge-Coupled-Device-(CCD)-Detektor auf einer drehbaren Achse. Diese Vorrichtung führt Rotationsbewegungen in frei definierbaren Winkelschritten durch und kann entlang der Längsachse zwischen Röntgenröhre und CCD-Detektor bewegt werden. Das Objekt dreht sich in einem feststehenden Strahlengang. Durch die Verschiebung entlang der Längsachse wird ein variabler Vergrößerungsmaßstab und zudem die Untersuchung von Proben bis zu einem Durchmesser von 1,5 cm ermöglicht (Langheinrich et al. 2004). Das Projektionsbild des Objektes auf dem CCD-Detektor sollte nicht breiter als der Detektor selbst sein, um Bildberechnungsartefakte zu verhindern. Die Brennfleckgröße begrenzt die theoretische Möglichkeit, ein sehr kleines Objekt dicht an die Strahlenquelle heranzuführen, um so einen möglichst hohen Vergrößerungsfaktor zu erzielen. Bei zunehmender Annäherung des Objekts an die Strahlenquelle wird das Projektionsbild des Objektes entsprechend unscharf, da auch die Mikrofokusröhre noch einen Fokus von mehreren μm hat. Die Fokusgröße bestimmt also die maximale Auflösung: Je kleiner der Fokus jedoch ist, desto geringer wird auch die Leistung der Röntgenröhre. Daraus ergeben sich für die Mikro-CT lange Messzeiten bei geringen Probengrößen. Die luftgekühlte Mikrofokusröhre des Gerätes, kann bei Beschleunigungsspannungen von 20 bis 80 kV bei einem Röhrenstrom von 0-100 mA und einer Leistung von 8 W betrieben werden. Als Detektor dient eine ca. 25 μm dicke Szintillatorschicht, die auf dem Kamerafenster einer elektronisch gekühlten CCD-Kamera mit 1024*1024 Pixeln aufliegt. Er lässt einen maximalen Bildausschnitt (Field of View, FOV) von 25 mm zu. Eine kontinuierliche Überwachung der Probe ist durch eine kleine optische Kamera

gewährleistet. Die Spannungsquelle und die Steuerelektronik sind im Scanner untergebracht. Für die Bilderzeugung durch die Mikrofokusröhre werden Röntgenquanten erzeugt und kegel- oder fächerförmig fokussiert (Abbildung 1). Beim Durchtritt durch das Objekt werden sie geschwächt und der CCD-Detektor misst die ankommende Röntgenstrahlung, die in ein digitales Signal umgewandelt wird. Es können so in $0,45^\circ$ oder $0,90^\circ$ Winkelschritten Absorptionsbilder des Objektes erzeugt werden. Diese werden dann mit Hilfe einer Rückprojektionstechnik, dem Feldkamp-Algorithmus (von Birgelen et al. 1997, Nissen & Yock 2001, Costa et al. 2000), in axiale Schnittbilder umgewandelt. Es entstehen so Bilder mit einer Größe von ca. einem Megabyte (MB) aus isotropen Voxeln bei einer Akquisitionsmatrix von 1024×1024 Pixeln (Langheinrich et al. 2004).

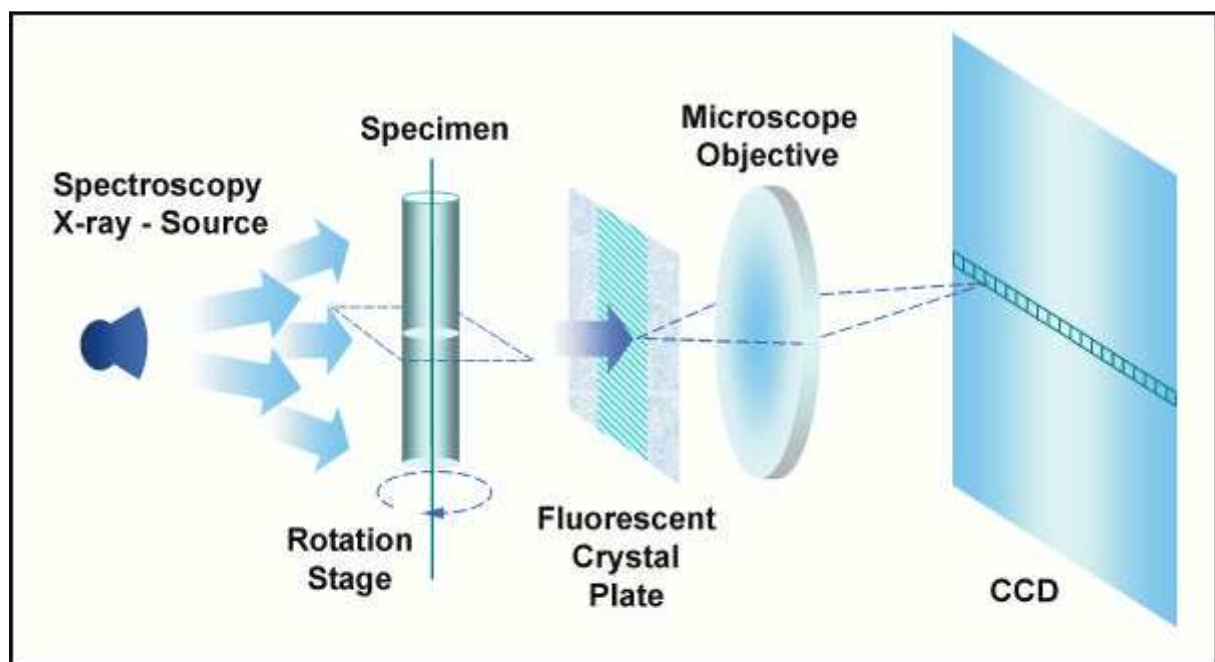


Abbildung 1. Schematische Darstellung eines mikro-CT mit Kegelstrahlgeometrie.

1.2.2 Synchrotronbasierte Mikro-CT

Die synchrotronbasierte Mikro-CT wird schon seit einigen Jahren im Bereich der experimentellen, bildgebenden Verfahren eingesetzt. Mittels Parallelstrahlgeometrie wird ein hoher Photonenfluss generiert (Abbildung 2). Aus einem kontinuierlichen

Energiespektrum wird durch einen Monochromator eine definierte Photonenenergie herausgefiltert. Mit Hilfe der intensiven Strahlenflussdichte wird die Scandauer deutlich reduziert. Eine geringe Strahlendivergenz parallel emittierter Röntgenquanten erlaubt eine genaue dreidimensionale Datenerstellung. Die Energie des monochromatischen Strahls liegt um den Faktor 10^6 - 10^8 höher im Vergleich zur Röntgenstrahlung in Kegelstrahlgeometrie, weshalb sehr hohe räumliche Auflösungen und viel kürzere Messzeiten erzielt werden können (Ritman, Jorgensen & Lund 1997, Michniewicz 2007).

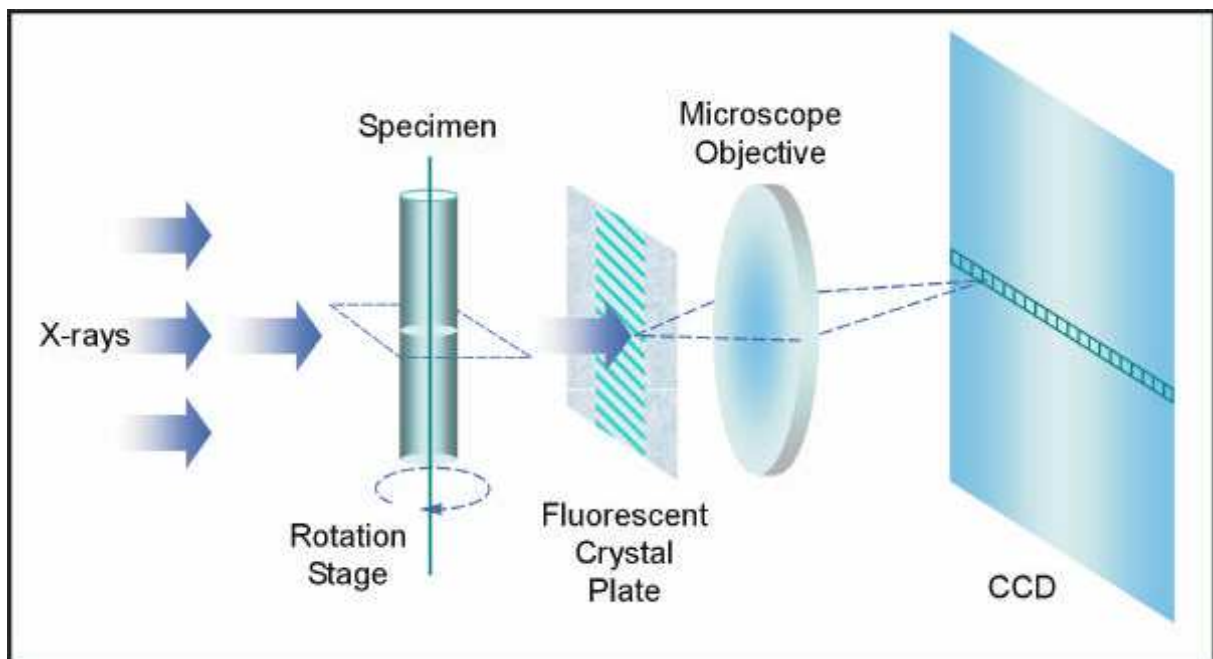


Abbildung 2. Parallelstrahlgeometrie für Synchrotronstrahlenquellen.

1.2.3 Nano-Computertomographie:

Der von uns verwendete Nano-Computertomograph (Nano-CT) wurde von SkyScan[®] (Kontich, Belgium) hergestellt und entwickelt (Nano-CT_2011). Als Röntgenröhre dient eine sog. Open Type X-Ray Source, bestehend aus einer offenen, d.h. pumpenevakuierten Nanofokusröntgenröhre, einer Lanthaniumborid- (LaB₆-) Kathode mit zwei horizontal und vertikal nachgeschalteten Kondensor- und Objektivlektronenlinsen (Fa. Tohken, Japan). Die Anode besteht aus einer mit 5 mm Wolfram beschichteten, 250 mm starken Berylliumglasplatte, auf welcher bei Beschleunigungsspannungen von 20 – 80 KV und einem Röhrenstrom von 100 –

200 μA Röntgenstrahlung erzeugt wird. Um eine Auflösung von 200-300 nm Voxelkantenlänge zu erzielen, werden im nano-CT Brennfleckgrößen < 400 nm eingesetzt. Auf Grund der geringen Brennfleckgröße wird der Strahlenabsorption ein weiterer Kontrastverstärkungsmechanismus überlagert, der sogenannte Small Angle X-Ray Scattering Effekt (SAXS). Hierbei entsteht ab einer Brennfleckgröße < 1 mm eine Kantenkontrastverstärkung an Oberflächen und internen Grenzflächen mit unterschiedlicher Dichte. Die Probe wird auf einer luftgelagerten Rotationsbühne zwischen Anode und Röntgendetektor fixiert und ist in drei Raumrichtungen mit einer Präzision bis 100 nm justierbar. Die Rotationsbewegung der Probe ist in Winkelschritten bis 0.1° frei definierbar und orientiert sich an der angewählten Brennfleck- und der Objektgröße. Zusätzlich ist die Rotationsbühne auf einem in Z-Richtung zwischen Brennfleck und Bildverstärker verschiebbaren Schlitten gelagert, wodurch Vergrößerungen realisiert werden. Dem Bilderzeugungssystem, bestehend aus Cäsiumjodid-Szintillatorschicht und CCD-Kamera ist ein Multi-Channel Single-Photon Amplifier zwischengeschaltet. Selbiger wandelt das primäre Szintillatorbild in ein Elektronenbild, amplifiziert dieses, wandelt es in ein optisches Bild zurück und sendet dieses an die 1280×1024 Pixel / 12 bit digitale CCD-Kamera. Die anschließende Bildrekonstruktion mittels modifiziertem Feldkamp-Algorithmus der durchschnittlich 0,5 – 2,5 GB großen Rohdatensätze benötigt bei Verwendung eines dualen Intel[®]Xeon[™] Prozessors (64 bit, 2 x 3 GHz, 32 GB RAM) zwischen 20 und 60 min.

1.3 Tiermodelle der Sinus- und Hirnvenenthrombose und Thromboseinduktion

Im Gegensatz zum ischämischen arteriellen Hirninfarkt existieren nur wenige tierexperimentelle Untersuchungen zur SHVT. Die wenigen Untersuchungen wurden an Ratten, Schweinen, Katzen, Gerbil und Kaninchen durchgeführt (Ito et al. 1997, Röther et al. 1996, Fries et al. 1990, Frerichs et al. 1994, Ungersböck, Heimann & Kempfski 1993, Röttger et al. 2005, Fries et al. 1992g, Gotoh, Ohmoto & Kuyama 1993, Nakase, Heimann & Kempfski 1996, Wang 2010). Diese Methoden stellten größtenteils invasive Eingriffe dar und führten nicht selten zu iatrogenen Parenchymdefekten am Gehirn. Darüber hinaus waren diese Methoden nur begrenzt

übertragbar, da die Thrombosedauer oder die Rekanalisation nicht beeinflussbar waren. Die Untersuchung zur Wirksamkeit von Therapiemöglichkeiten und Bewertung derselben war nur eingeschränkt möglich. Gegenstand der Untersuchungen waren die Änderung der regionalen zerebralen Hirndurchblutung infolge der SHVT mit der Laser-Doppler-Flowmetrie oder der Hydrogen Clearance Methode, oximetrische Messungen der regionalen Sauerstoffsättigung, Messung des intrakraniellen Drucks (ICP) mittels Parenchym- und Ventrikelsonden und der Fluorescein Angiographie zum Nachweis einer Blut-Hirn-Schrankenstörung. Sämtliche dieser Untersuchungen nutzten die Möglichkeit einer histopathologischen Aufarbeitung. Angiogeneseuntersuchung wurden bisher nur bei Tiermodellen der arteriovenösen Fisteln (Rothbart et al. 1996, Terada et al. 1996, Shin et al. 2007), die u.a. durch operative Anastomisierung der A. carotis und der V. jugularis teilweise mit der Induktion einer Sinusthrombose geschaffen wurde. Verschiedene Formen zur Thromboseinduktion wurden durchgeführt. Wang et al. erzeugten die Sinusthrombose mit Thrombininjektion und Ballondilatation bei Schweinen (2010), Stracke et al verwendeten humane Blutkoagel bei Schweinen und untersuchten diese mittels MR Bildgebung (2006, 2007), Schaller et al. induzierten eine Sinusthrombose mit Ligatur des posterioren Anteils des Sinus sagittalis superior (SSS) bei der Katze (2003), Röttger et al. mit topischer Applikation von Eisen-III-Chlorid bei Ratten (2005). Während sämtliche o.e. Modelle ein reversibles Modell darstellten und die Beurteilbarkeit der Klinik, Diagnostik sowie Anwendungen von Therapiemöglichkeiten begrenzt erscheinen ließen, zeigt unser Modell einen dauerhaften Verschluss des SSS Verschluss über eine Zeitdauer von sechs Wochen und erlaubt pathophysiologische Zusammenhänge nach permanentem Verschluss über längere Zeit zu untersuchen.

1.4 Angiogenese

Das Blutgefäßsystem entwickelt sich bereits während der Embryogenese. Im Erwachsenenalter ist das Gefäßwachstum bereits nahezu komplett abgeschlossen. Bei pathologischen Bedingungen wie Tumorwachstum, Inflammation sowie Gewebeischämie findet eine Reaktivierung eines Gefäßwachstums statt. Drei unterschiedliche Prozesse kommen bei der Gefäßneubildung vor, die

Vaskulogenese, Angiogenese sowie die Arteriogenese (Carmeliet 2000). In der Embryonalentwicklung beginnt die Entstehung des Blutgefäßsystems mit einer Differenzierung von Hämangioblasten aus dem Mesoderm des Dottersacks. Die Hämangioblasten schließen sich zu zellulären Aggregaten zusammen, deren äußere Zellen sich zu primitiven Endothelzellen entwickeln (Carmeliet 2000). Im Verlauf fusionieren die Endothelzellen, wodurch ein primitives Gefäßnetzwerk entsteht und sich im Verlauf zu einem komplexen System fortentwickelt. Die Bildung eines reifen Gefäßsystems erfolgt durch die Angiogenese und Arteriogenese. Angiogenese im erwachsenen Organismus bezeichnet die Aussprossung von Kapillaren aus vorbestehenden Gefäßen und wird z.B. bei einer Gewebischämie durch Hypoxie induziert (Heil et al. 2006). Im Zentrum des regenerativen Gefäßwachstums nach Ischämie steht der Hypoxia-Inducible-Factor 1 (HIF-1), ein globaler Regulator der Sauerstoffhomöostase (Deindl et al. 2001). Unter dem Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) mit konsekutiver Vasodilatation wird eine Zunahme der Gefäßpermeabilität bewirkt. Das Gefäßendothel sezerniert verschiedene Proteasen wie den Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) oder Metalloproteasen, die sowohl die Basalmembran und die engen Zellkontakte auflösen, als auch Wachstumsfaktoren wie z.B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Fibroblast-Growth-factor 2 (FGF-2) proteolytisch freisetzen und aktivieren (Henke 2007). Arteriogenese beschreibt das Auswachsen des intraluminalen Durchmessers präformierter Kollateralen zu funktionell wichtigen Arterien infolge physikalischer Kräfte wie erhöhten Blutfluss nach Okklusion oder Stenosen von Versorgungsgefäßen (Carmeliet 2000). In ursprünglich minderperfundierten Kollateralen steigt der Blutfluss plötzlich an. Damit nehmen auf die Gefäßwand wirkende Scherkräfte zu, die zu einer Aktivierung von Endothelzellen führen und dadurch eine Expression von Zytokinen und Adhäsionsmoleküle herbeiführen. Monozyten werden angezogen und infiltrieren die Gefäßwand. Diese exprimieren wiederum Zytokine (z.B. TNF α) und entwickeln nach Expressierung von uPA und Metalloproteinasen proteolytische Aktivität (Carmeliet 2003, Heil et al. 2006, Humphries et al. 2009). Es kommt zu einer enzymatischen Veränderung der Media und infolge einer Proliferation glatter Muskel- und Endothelzellen zu einer Vergrößerung der Gefäßdurchmessers.

1.5 Ziel der Arbeit und Fragestellung

Im Unterschied zu arteriellen Hirninfarkten kommt es bei mehr als der Hälfte der Patienten mit venösen Stauungsinfarkten zu einer Rückbildung oder deutlichen Verminderung des Läsionsvolumens (Röttger et al. 2004). Dies hängt im Endzustand nicht von einer Persistenz eines Verschlusses der Sinus- und Hirnvenen oder einer Rekanalisation dieser ab (Stolz et al. 2004). Somit scheint eine suffiziente Adaptation über bestehende Kollateralen oder Angiogenese zu greifen. Röttger et al. 2004 konnten 7 Tage nach Induktion einer Sinus sagittalis superior- Thrombose an einem dem Menschen sehr ähnlichen Tiermodell nicht nur Angiogenese im Thrombus und thrombusnahen, sondern auch in parasagittalen und temporalen Hirnregionen nachweisen.

Das MRT stellte bisher in den meisten Tiermodellen die bildgebende Diagnostik der Wahl dar. Der wichtigste Vorteil dieser Methode ist der nichtinvasive Charakter, die Möglichkeit einer wiederholten in-vivo Bildgebung. Neben Parenchymläsionen konnte allerdings bei begrenzter Ortsauflösung nur die Beurteilung der größeren Sinus und Hirnvenen jedoch nicht der kleineren kortikalen Venen oder eventueller neugebildeter Kapillaren erfolgen. Zur genaueren Untersuchung der Adaptationsprozesse nach SHVT modifizierten wir das von Röttger et al. etablierte Tiermodell an der Ratte und induzierten einen permanenten Verschluss des SSS über einen Zeitraum von sechs Wochen und führten die entnommenen Gehirne einer erstmaligen dreidimensionalen Darstellung mittels hochauflösender Mikro-CT und Nano-CT zu. Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit die mikro-CT und nano-CT als neue Methoden zur dreidimensionalen und lückenlosen Visualisierung des SSS Thrombosemodells an der Ratte zu evaluieren und insbesondere die durch eine Sinus- oder Hirnvenenthrombose induzierten Veränderungen in der Angioarchitektur des Hirns und eine mögliche durch die Thrombose angestoßene zerebrale Gefäßneubildung zu untersuchen und mit den gängigen histologischen Untersuchungen zu vergleichen.

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuchsantrag

Alle Tierversuche wurden nach Genehmigung des Versuchsvorhabens nach § 8 Abs. 2 des Tierschutzgesetzes (BGBl.I S.1105, Mai 1998, V54 – 19 c 20/15 – B 2/131) durchgeführt. Die Genehmigung wurde uns von der zuständigen Behörde vor Beginn des Versuchs erteilt.

2.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten zehn bis 12 Wochen alte und 277 bis 325 g schwere männliche Wistar Ratten (Harlan Winkelmann GmbH). Die Haltung der Ratten erfolgte in kleinen Gruppen zu jeweils fünf Tieren in Makrolonkäfigen. Die Tiere konnten zu jeder Zeit Wasser und Futtermittel (Altromin[®]) aufnehmen. Die Umgebungstemperatur und die Luftfeuchtigkeit wurden stets kontrolliert. Der Tag-Nacht- Rhythmus dauert jeweils 12 Stunden, die Belichtung wird durch Kunstlicht aufrechterhalten.

2.3 Narkose

Der klinische Zustand, die Atmung und die Herz-Kreislauf-Situation der Tiere wurden während des gesamten Operationszeitraums kontinuierlich überwacht. Die Narkose wurde jeweils mit 5% Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) in 1.0 l/min Luft eingeleitet. Die Dosis zur Aufrechterhaltung der Narkose während der Operation wurde nach Bedarf dosiert und lag zwischen 2-3% Isofluran in 0.5l/min Luft. Während der Operation wurde die rektale Körpertemperatur überwacht und durch ein thermostatisch regulierendes Wasserfluss-System konstant zwischen 36.5-37.5°C gehalten.

2.4 Versuchsgruppeneinteilung

1. Untersuchung

Gruppe 1: 4 Ratten mit Sinus sagittalis superior Okklusion und Gehirnentnahme 6 Stunden nach OP.

Gruppe 2: 4 Ratten dienten als Kontrolle.

2. Untersuchung

Im zweiten Experiment euthanasierten wir eine Gruppe 6 Stunden nach Sinus sagittalis superior Thromboseinduktion (Gruppe I, n=4) und eine Gruppe 6 Wochen nach Sinus sagittalis superior Thromboseinduktion (Gruppe II, n=7). Als Kontrolle dienten acht schein-operierte Tiere mit topischer Applikation von Kochsalzlösung.

2.5 Sinus sagittalis superior Thrombose

Die Lagerung des Kopfes erfolgte in einem stereotaktischen Rahmen. Initial wurde durch eine mediane Längsinzision der Kopfhaut über eine Länge von ca. 1,5 cm die Kalotte frei präpariert. Es folgten die Darstellung des Schädelknochens und eine ca. 10 mm x 2 mm messende osteoklastische Trepanation in der Mittellinie mittels eines Rosenkopfbohrers (Durchmesser 2 mm) unter mikroskopischer Kontrolle (Carl Zeiss, Inc., Wetzlar, Germany) und Wasserkühlung. Zur anatomischen Orientierung dienten median die Sagittalnaht, frontal das Bregma, occipital die Lambdanaht. Beim Herauslösen des Knochendeckels über dem Sinus sagittalis superior (SSS) wurde darauf geachtet die Dura mater nicht zu beschädigen. Nach Freilegung des SSS wurde ein mit Eisen-III-chlorid (40%`ig) getränkter Filterpapierstreifen auf den Sinus gelegt. In der Kontrollgruppe wurde statt Eisen-III-Chlorid NaCl-Lösung (Kochsalzlösung 0.9% der Firma Braun) verwendet. Berührungen mit dem umgebenden Cortex wurden sorgfältig vermieden. Um eine sichere Thrombosierung zu erreichen, wurde dieser Schritt weitere zweimal wiederholt. Jeweils nach Entfernung des Filterpapierstreifens wurde das Operationsfeld mit steriler NaCl-

Lösung (0,9%) gespült. Nach mehrfacher Spülung erfolgte die Hautnaht unter sterilen Bedingungen. Die Ratten wurden nach vollständigem Erwachen aus der Narkose in die Käfige verbracht.

2.6 Post mortem Präparation

Die Ratten wurden nach Ablauf von 6 Stunden bzw. 6 Wochen nach Thrombosierung des SSS zur Operation erneut mit 5% Isofluran in 3 l/min Luft für zwei Minuten tief narkotisiert. Die narkotisierten Tiere wurden in einer speziellen Haltevorrichtung fixiert. Dazu wurden die Schneidezähne in einer Kunststoffhalterung befestigt. Mit dieser Halterung wurde der Kopf der Versuchstiere fest in eine konusförmig ausgefräste Kopfhalterung hineingezogen. Zwei in die Vorderpartie dieser Kopfhalterung eingebrachten Bohrungen gewährleisteten den Zu- und Abfluss der im Verlauf mit 2-3 % Isofluran in 0,5 l/min Luft narkotisierten Ratte (Abbildung 3).

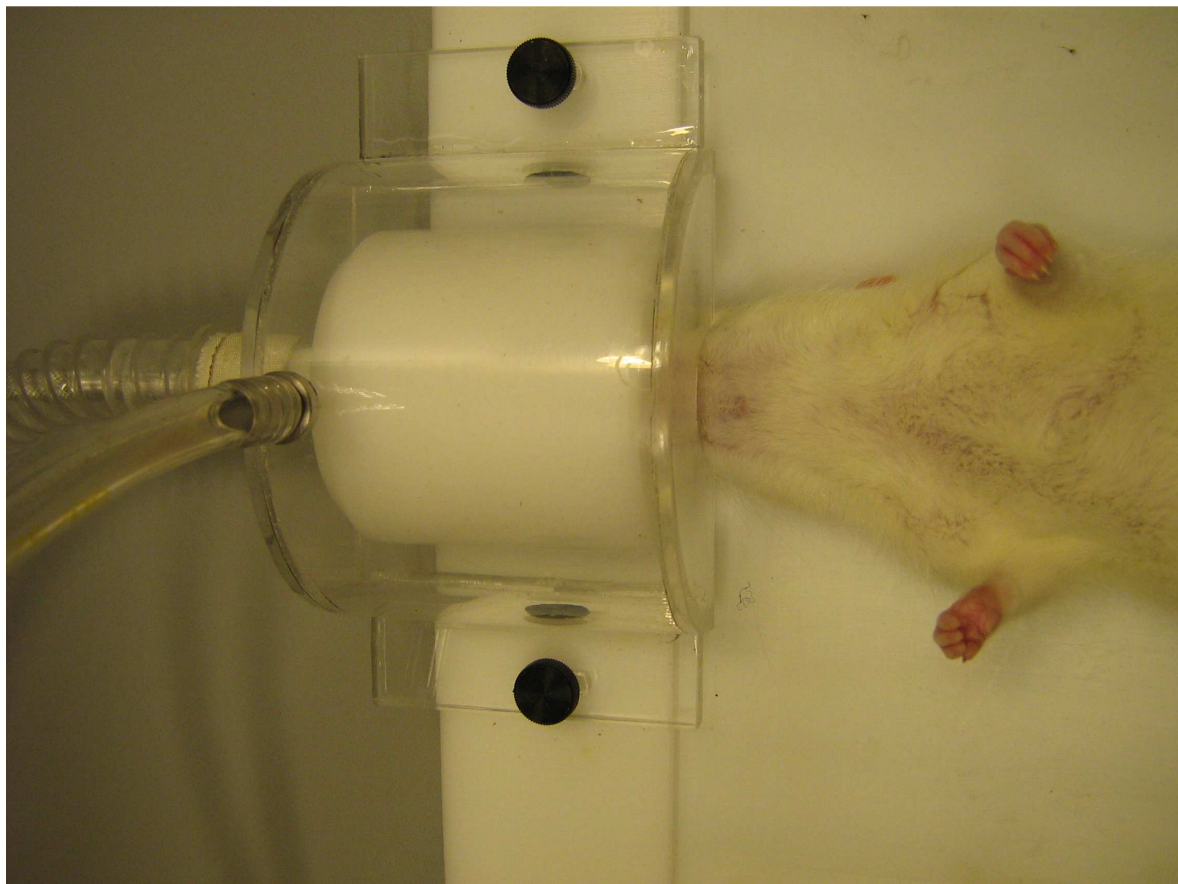


Abbildung 3. Wärmebrettkonstruktion mit einem Warmwasserdurchlauf mit eingebauter Narkosemaske (Eigenbau des Institutes).

Anschließend wurden die so fixierten Versuchstiere auf den Rücken gedreht. Anschließend erfolgte unterhalb des Diaphragmas die Eröffnung des Abdomens. Nach sorgfältiger Abtragung des Diaphragmas wurde das Herz-Lungen-Paket dargestellt. Bilateral vom Sternum wurde der Brustkorb bis zur oberen Thoraxapertur abgetrennt. Hierbei wurde sorgfältig auf die Unversehrtheit der vom Herz abgehenden Arterien geachtet. Die linke Herzkammer wurde nun in Höhe der Herzspitze mit einem kleinen Schnitt für eine Kanüle (Butterfly) zugänglich gemacht, diese eingeführt und mittels einer Arterienklemme so befestigt, dass keine Flüssigkeit herausfließen konnte. Die Kanüle war mit einem Perfusionssystem verbunden, das mit einem konstanten Perfusionsdruck von 1,5 m Wassersäule mit 0,9 %-iger NaCl Lösung (isotone Kochsalzlösung 0,9 % der Firma Braun) + 5.000 I.E./l Heparin-Natrium (Firma Ratiopharm, Deutschland) das Blut aus dem Gefäßsystem ausspülte. Nach etwa 5 Minuten war mit Austritt klarer Flüssigkeit aus dem rechten Atrium das Gefäßsystem komplett ausgespült worden. Vorher war zeitgleich mit der Perfusion durch einen Schnitt in das rechte Herzohr ein Druckausgleich zum Perfusionsdruck geschaffen worden. Das Heparin-Natrium wurde hier als Gerinnungshemmer eingesetzt, um das Gefäßsystem koagelfrei sicher zu durchspülen. Nach der Perfusion wurden unter mikroskopischer Sicht die Aorta ascendens direkt nach Abgang aus dem Herzen und die Aorta descendens vor dem Abgang der A. subclavia links mit einem 4-0 Faden (Firma Johnson&Johnson, Deutschland) aus Seide ligiert. Anschließend wurden nach Abtragung der Faszien und Muskeln die Ae. carotides externae bds. sowie die Ae. pterygopalatinae bds. ligiert um einen unnötigen Verlust an Kontrastmittel zu verhindern. Zur Darstellung und Quantifizierung des Gefäßbaumes in der Mikro-Computertomographie, wurde das Verfahren einer direkten, intraarteriellen Applikation von Kontrastmittel angewendet. Dazu wurde über eine Punktion der Aorta ascendens das röntgendichte Kontrastmittel MICROFIL der Firma Flow Tech, Inc., Massachusetts, USA verwendet.

Das Kontrastmittel Microfil setzt sich aus drei Komponenten zusammen, MV Compound, MV Diluent und MV Curing Agent. Im Verhältnis 5 ml:5 ml:0,5 ml wurden die Komponenten auf einem Magnetrührer 3 Minuten sorgfältig miteinander vermischt und die Gebrauchslösung unter einem konstanten physiologischen Druck von ca. 100 cm H₂O über die Aorta ascendens appliziert und zunächst über die Ae.

carotides internae und Ae. vertebrales bds. das arterielle Gefäßsystem und anschließend das venöse Gefäßsystem gefüllt. Die Applikation des Kontrastmittels wurde unter mikroskopischer Sichtkontrolle durchgeführt, bis aus beiden Vv. jugulares externae und aus dem rechten Herzohr das bereits zirkulierte Kontrastmittel wieder herausfloss, wobei auf eine homogene Konsistenz ohne Blutanteile geachtet wurde. Bei nicht genügend langer Spülung der Gefäße mit NaCl vor der Kontrastmittelperfusion kann es zur Vermischung von Restblut mit dem Kontrastmittel kommen, was zu einer ungleichen Aushärtung führen kann und sich anschließend als lückenhafte Gefäßperfusion mit falsch negativen Volumina errechnet. Das Agens agglomerierte in etwa 45 Minuten unter Raumtemperatur zu einer viskösen Konsistenz und war zur weiteren Präparation des Gehirns zugänglich. Zur Entnahme des Gehirns wurde die Kopfhaut zunächst mit einer Mittellinieninzision von caudal nach rostral eröffnet. Nach der Freilegung der Schädelkalotte wurde das Os occipitale im caudalen Bereich mit einer Knochenzange entfernt und das Kleinhirn dargestellt. Anschließend erfolgte im rostralen Bereich die Durchtrennung des Os frontale durch eine Feinsäge und die Eröffnung der Schädelkalotte entlang der Sutura interfrontalis mit einer kleinen Schere. Beide Kalottenhälften ließen sich nun mit einer Knochenzange vom Gehirn entfernen. Abschließend wurde das Gehirn mit erhaltener Dura mit Hilfe eines kleinen Spatels herausgelöst und in einen Behälter mit 4,5 % -igem Formaldehyd gelegt.

2.7 Mikro-Computertomographie

Nach Entnahme der in 4,5 % -igem Formalin gelagerten Gehirne wurden sie in Parafilmfolie gewickelt und auf der Probenhalterung mit Hilfe einer Formmasse zentriert fixiert. Durch die Parafilmfolie wird ein Austrocknen der Probe während des Scanvorgangs verhindert. Zur Messung wurde der Probenhalter in den Scanner eingesetzt und seine optimale Positionierung durch Anfertigung eines Übersichtsbildes (Scout view) des zu scannenden Anteils der Probe überprüft. Die Messungen erfolgten bei einer Röhrenspannung von 80 kV, einem Strom von 100 mA, ohne Vorfilterung des Röhrenspektrums und mit einer Belichtungszeit von 2,4 s pro Rotationsschritt.

Pro Rotationsschritt wurden 3 Bilder erzeugt, aus denen der Durchschnitt errechnet wurde. Die Rotationswinkelschritte betragen $0,45^\circ$ bei einer Drehung um 180° und es wurden Absorptionsbilder bei einer Akquisitionsmatrix von 1024×1024 Pixel erzeugt, die mit Hilfe der Rückprojektionstechnik in isotrope, axiale Schnittbilder umgewandelt werden konnten. Die Expositionszeit wurde nach der Auswertung einer Absorptionskurve im Topogramm ermittelt, dies diente der Vermeidung von Über- und Unterbelichtungen. Vor dem Entfernen des Probenzylinders aus dem Gerät ließ sich die ausreichende Bildqualität anhand der Anfertigung eines einzelnen Rekonstruktionsbildes überprüfen. Die Auswertung der in der Mikro-CT gescannten Gehirnproben erfolgte mit dem Programm Analyze 7.0 (Mayo Foundation for Medical Education and Research, Lenexa, Kansas, USA). Mit diesem Programm mussten die vorhandenen Schnittbilder im Bitmap-Format zunächst in Volumendatensätze umgewandelt werden, um eine dreidimensionale Darstellung der Proben zu ermöglichen. Die Funktion „Volume Render“ führte nach einer quantitativen Analyse sämtlicher in den Bildern vorkommender Grauwerte eine Berechnung des Gesamtgewebevolumens und des Gefäßvolumens jeder Probe aus.

2.8 Mikro-Computertomographie mit Synchrotronstrahlung

Zur detaillierten Analyse der Neoangiogenese nach einer SSS Thrombose am Rattenmodell wurden die Proben mit der synchrotronbasierten Micro-Computertomographie untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Beamline X2B am Synchrotron der National Synchrotron Light Source (NSLS) an den Brookhaven National Laboratories, Upton, NY, USA (Ritman 1997) verwendet. Drei Proben der Gruppe II wurden unter identischen Bedingungen mit einer nominalen Photonenenergie von 18 KeV und einer Bandbreite von 50 eV erfasst. Die dreidimensionalen Aufnahmen bestanden aus annähernd 1440 zweidimensionalen Schichten mit einer 2300×1300 planer Datenmatrix, resultierend wurde ein isotropes Auflösungsvermögen von $1,9 \mu\text{m}$ Voxelgröße erreicht. Nach der Datenerfassung wurden die Projektionen zu Schnittbildern mit einer 16-bit Grauwertverteilung rekonstruiert.

2.9 Nano-Computertomographie

Für weitere detaillierte Messungen wurden Proben aus dem Bereich des SSS mittels Nano-CT (Nano-CT_2011; Skyscan, Kontich, Belgien) mit einer Röntgenröhre, einer sog. Open Type X-Ray Source, mit einer Brennfleckgröße von <400 nm zugeführt. Die Probe wurde auf einer computerkontrollierten luftgelagerten Rotationsbühne zwischen Anode und Röntgendetektor fixiert und in 0,5° Winkelschritten 180° um die vertikale Achse bei einer Röhrenspannung von 40 kVp gemessen. Die Akquisitionszeit betrug für jeden Rotationsschritt 2,4 Sekunden. Es wurden Absorptionbilder bei einer Akquisitionsmatrix von 1280 x 1024 Pixel/12 bit erzeugt, die mit Hilfe der Rückprojektionstechnik in isotrope, axiale Schnittbilder mit einem Auflösungsvermögen von 900 nm umgewandelt werden konnten. Die Projektionen wurden zu Schnittbildern mit einer 8-bit Grauverteilung rekonstruiert.

2.10 Histologische Aufarbeitung

Im Anschluss an die Probenpräparation und die Untersuchungen in der Mikro-CT und Nano-CT wurden die Proben in Paraffin eingebettet, histologische Schnitte von einem Querschnitt von 6 µm mittels Mikrotom angefertigt und diese dann mit einem polyklonalen Kaninchen Antikörper gegen VEGF-Antigen (1:100; VEGF [A20]:sc-152; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) gefärbt und mit Haematoxylin-Eosin gegengefärbt (DAKO, S2020, 1:2, DAKO A/S Glostrup, Dänemark). Die histologischen Querschnittsbilder wurden mittels Mikroskop mit integrierter Kamera (Axioskop, Zeiss, Deutschland; Kamera: JVC, KY-F75U, Japan) digitalisiert und mit den Mikro-/Nano-CT Bildern verglichen.

2.11 Quantitative Reverse Transkriptions–Polymerase Kettenreaktion

RNA wurde entweder vom Hirnparenchym oder vom thrombosiertem Areal über dem SSS unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), synthetisiertem cDNA isoliert und der Real-time Reverse Transkriptions–Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit Sybr Green Sensi Mix (Peqlab, Erlangen, Deutschland) und MxPro 3000 (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) unterzogen.

2.12 Statistik

Die statistischen Berechnungen werden mit Hilfe des Analyseprogramm JMP 6.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Alle Angaben im Text und der Abbildungen wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) angegeben. Zur Ermittlung statistischer Unterschiede zwischen den Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) und der Tukey-Kramer Gegentest mit Fehlerkorrektur für mehrere Vergleiche verwendet. Individuelle Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des unpaaren Student t-Test durchgeführt. Die statistische Wahrscheinlichkeit wurde mit einem Wert von $p < 0,05$ in allen Berechnungen als signifikant angenommen.

2.13 Neurologische Beurteilung der Tiere

2.13.1 Rotarod Test

Der Rotarod-Test wurde ursprünglich als Neurotoxizitätstest von Dunham und Mija (1957) beschrieben und basiert auf der Annahme, dass Tiere mit neurologischen Defiziten und verminderter motorischer Koordinationsfähigkeit nicht auf einem rotierenden Stab zu balancieren vermögen und herunterfallen. Hamm und Kollegen modifizierten den Rotarod-Test, der standardmäßig in unserem Projekt angewendet wurde (1994). Der Rotarod Test ist besonders geeignet, standardisiert die motorischen Funktionen der Versuchstiere zu messen. Der Test erfolgte am wachen Tier wöchentlich nach Thromboseinduktion. Um Lerneffekt und tatsächliche klinische Besserung voneinander zu trennen, erfolgte ein Rotarod Training mindestens zwei mal 24 h vor der geplanten OP.

Die Ratte wurde außen auf ein Laufrad mit querverlaufenden Streben gesetzt. Die Geschwindigkeit der Umdrehung dieses Laufrades wurde alle 10 Sekunden gesteigert (initial 6, dann 12, 18, 24 und 30 Umdrehungen pro Minute). Griff die Ratte mit den Krallen nur die Verstreben, ohne sich aktiv auf dem Rad fortzubewegen oder fiel das Tier vom Laufrad auf eine gepolsterte Unterlage innerhalb der 10 Sekunden, so gilt der Test bei entsprechender Geschwindigkeit als nicht bestanden.

2.13.2 Neurologischer Defizit Score

Die funktionelle Testung der Tiere wurde mit einem Neurologischen Defizit Score mit 9 bzw. 10 Elementen (Nedelmann et al. 2007) durchgeführt (Abb. 4). Die Studie wurde mit dem neunteiligen Score durchgeführt. Dieser neurologische Score beinhaltet verschiedene motorische, koordinative und sensorische Elemente, welche mit den Werten zwischen 0 (keine Beeinträchtigung) und 10 (Beeinträchtigung) bewertet werden.

Kurzbeschreibung der Elemente:

- kontralaterale Vorderfußbeugung: Diese wird als pathologisch bewertet, wenn die Ratte nach vorsichtigem Anheben am Schwanz keine Extension der linken Vorderpfote zeigt (Zeichen einer Hemiparese)
- Instabilität bei seitlichem Druck von rechts
- Schwanzhängen: Die Ratte wird vorsichtig am Schwanz angehoben. Pathologisch ist ein Hochwinden der Ratte nach links in 3 reproduzierbaren Versuchen
- Laufen auf dem Beam („Beam walk“): Hier wird das Verhalten der Tiere auf dem Beam bewertet und mit dem Verhalten vor dem operativen Eingriff verglichen
- Laufen auf dem Boden: Hier gab es Abstufungen in der Bewertung. Eine abnormale Bewegung wie Zirkeln („circling“) oder eine driftende Bewegung („drifting“) wurde mit 5 bewertet, wohingegen eine Bewegungsunfähigkeit mit 10 bewertet wurde.
- Schnurrhaarbewegung: Pathologisch ist das Fehlen der Bewegungen auf einer Seite
- Bewusstsein: Pathologisch ist die fehlende Reaktion des Tieres auf akustische oder andere Stimuli
- Hören: Zum Ermitteln des Hörvermögens wird über dem Tier außerhalb des Gesichtsfeldes mit den Händen geklatscht. Pathologisch ist die fehlende Schreckreaktion.
- Sehen: Reagierte das Tier auf keinen visuellen Stimulus von der einen Seite wird ein pathologisches Ergebnis gescort (Zeichen der Hemianopsie)

Insgesamt kann sich dadurch ein maximaler pathologischer Wert von 90 (bzw. 100) Punkten ergeben.

Klinischer Score	
<i>Vorderbeinflexion:</i>	
Normal	0
Flexion	10
<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: Hemianopia:</i>	
Normal	0
Keine Reaktion auf eine Bedrohung von der Seite	10

Protokoll der neurologischen Bewertungen. In das Protokoll für die neurologische Beurteilung werden die verschiedenen Bewertungskriterien der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum dokumentiert.

3. ERGEBNISSE

Das SSS Thrombose Model an der Ratte wurde von Röttger et al. bereits 2005 etabliert und ist weitgehend bekannt. Das Model wurde von uns dahingehend modifiziert, dass bei allen Tieren eine permanente SSS Okklusion mittels topischer Eisen-III-Chlorid Applikation ohne Rekanalisierung über 6 Wochen erreicht wurde. Keines der Tiere entwickelte einen venösen Infarkt. Alle Tiere überlebten die sechs Wochen. Wie bereits oben erläutert verglichen wir im 2. Experiment eine Kontrollgruppe von 8 Tieren ohne SSS Thrombose mit Ratten mit SSS Thrombosen und Gehirnentnahme sechs Stunden nach Thromboseinduktion (Gruppe I), um den akuten Zustand abzubilden sowie mit Ratten mit SSS Thrombose und Gehirnentnahme 6 Wochen nach Okklusion des SSS (Gruppe II) um einen Langzeitverlauf und –veränderungen abzubilden und diese miteinander zu vergleichen. Eine Rekanalisation wurde bei keinem Tier beobachtet.

3.1. Ergebnisse der 1. Untersuchung:

3.1.1 Mikro-Computertomographie

Während das MRT und die MRA bisher in den wenigen tierexperimentellen Modellen hinsichtlich der SSS Thrombose die Bildgebung der Wahl darstellten und neben Parenchymdarstellung lediglich die Sinus und größere Venen visualisieren konnten, gelang uns erstmals eine dreidimensionale Darstellung des homogen kontrastmittelgefüllten arteriellen Circulus Willisi und des venösen Gefäßsystems inklusive der Sinus durae matris und der tiefen Hirnvenen der Ratte mit der Mikro-CT Bildgebung (Voxel-Größe $8 \mu\text{m}^3$). In allen Proben der Gruppe 1 zeigte sich der SSS verschlossen. In Abbildung 4 werden makroskopisches Bild (A und B), ein Mikro-CT Nativbild (C) sowie die Rekonstruktion des arteriellen Gefäßsystems mit Beschreibung der einzelnen Arterien (D) dargestellt.

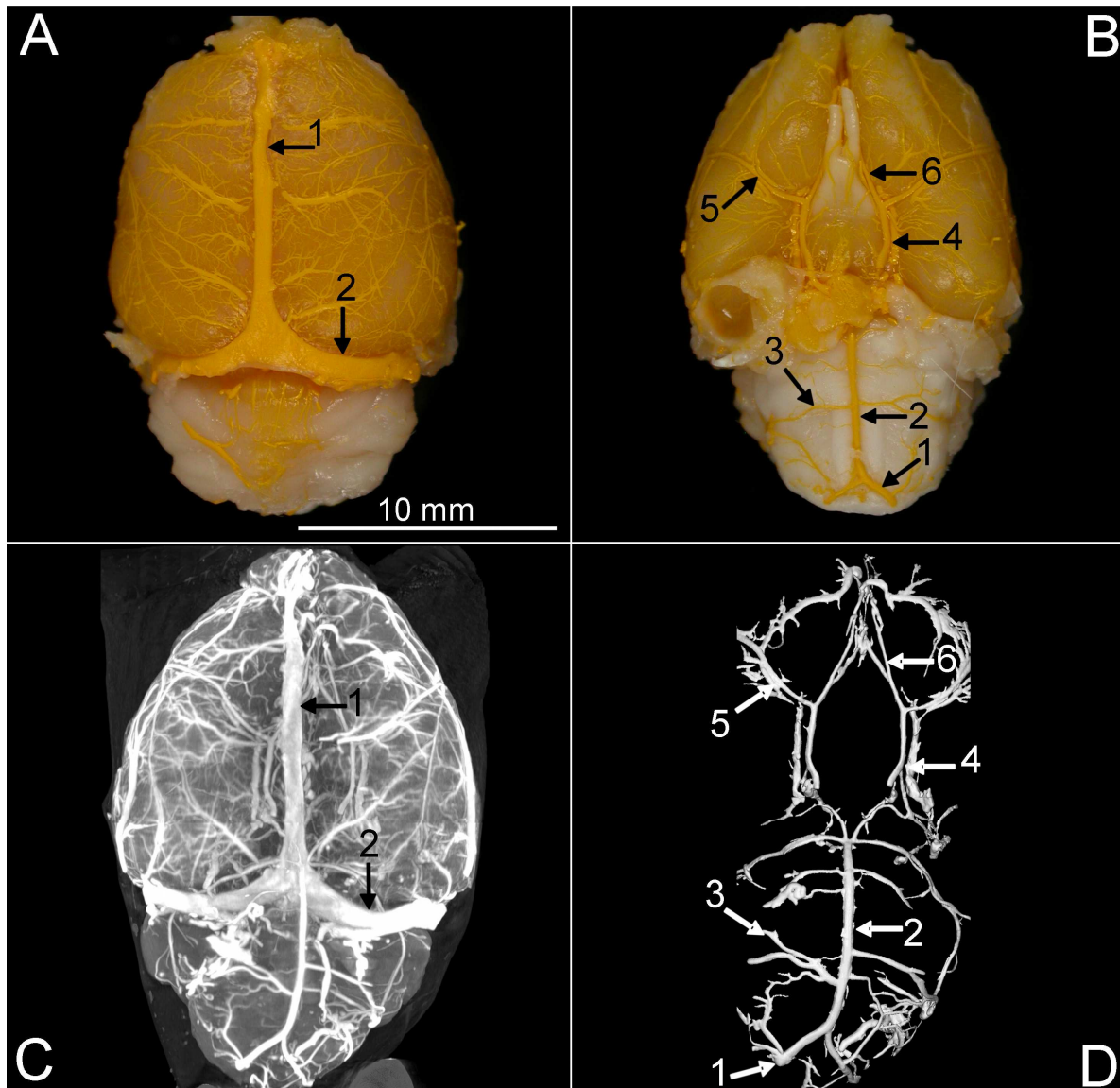


Abbildung 4. Makroskopisches Bild (A, kranial; B, kaudal) der zerebralen Gefäßstruktur nach Perfusion mittels Microfill. C, Maximum-intensity projection (MIP) mikro-CT Bild des arteriellen (Circulus Willisi) und des venösen Systems. Der Circulus willisi wird von den Vertebralarterien und von den Ae. carotis internae gefüllt. Der Circulus Willisi selbst ist mit der A. cerebri anterior, media, posterior sowie Anteilen von der a. cerebella superior, die A. carotis anterior sowie die A. communicans posterior dargestellt (D). A, C, 1. Sinus sagittalis superior, 2. Sinus transversus; B, D, 1. A. vertebralis, 2. A. basilaris, 3. A. cerebelli anterior inferior, 4. A. carotis interna, 5. A. cerebri media, 6. A. cerebri anterior.

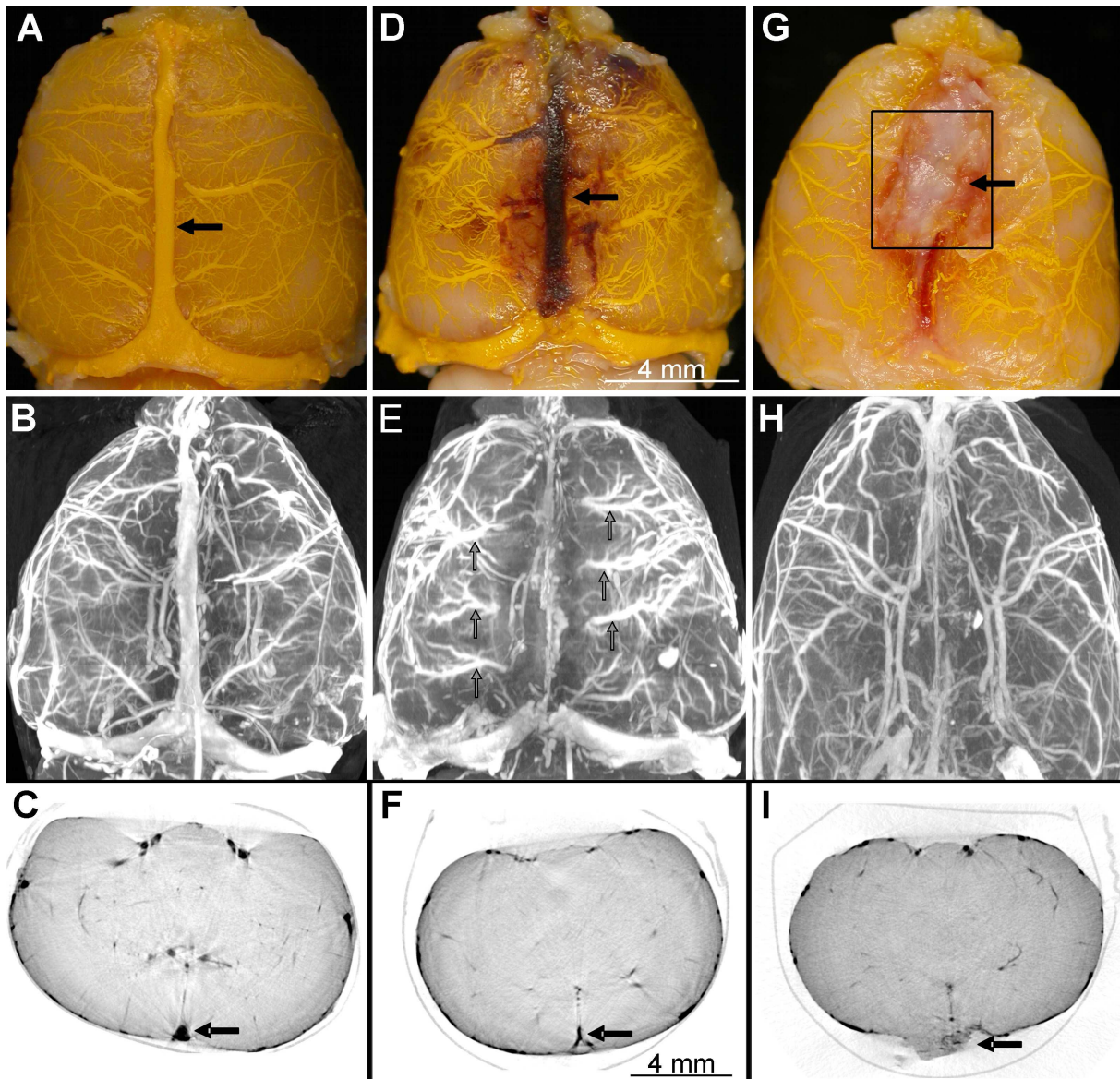


Abbildung 5. Repräsentative makroskopische und mikro-computertomographische Bilder. Obere Reihe zeigt die makroskopische Darstellung des MicrofilTM gefüllten Gehirns. Die schwarzen Pfeile zeigen den okkludierten Sinus sagittalis superior in einem etwa 1 cm messenden Abschnitt, Die mittlere und untere Reihe zeigen die korrespondierenden Mikro-CT Bilder. Maximum-intensity projection (MIP) und koronare Schnitte. Die schwarzen Pfeile zeigen den SSS. A, B, und C: sham-op Kontrollen. D, E, und F: SSS Thrombose nach 6 Stunden. Beachte die erweiterten Brückenvenen (graue Pfeile). G, H, und I: SSS Thrombose nach 6 Wochen.

Die Möglichkeit der Darstellung von zusätzlichen Komplikationen einer Sinusthrombose ist mittels Mikro-CT im Tiermodell auch gegeben (Abbildung 6); so konnte eine Ventrikelblutung in Form einer Kontrastmittelansammlung im Ventrikelsystem in einer Probe im 1. Experiment dargestellt werden.

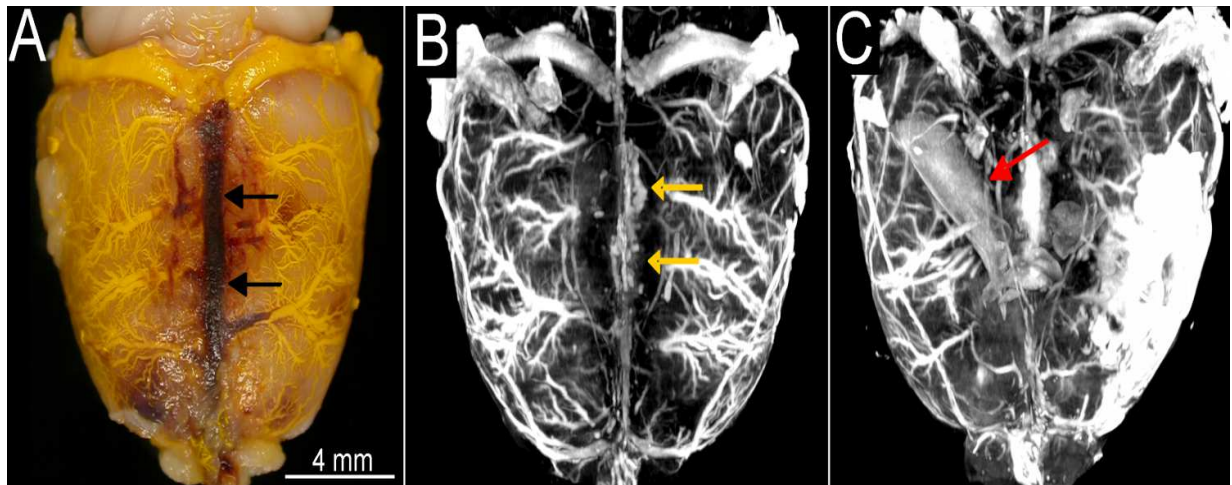


Abbildung 6. Makroskopisches Bild des Rattengehirns nach Induktion der SSS Thrombose (schwarze Pfeile). Mikro-CT Bilder (B, maximum intensity projection) demonstrieren SSS Thrombose (gelbe Pfeile) mit konkomitant erweiterten kortikalen Venen. MIP (C) Mikro-CT Bild demonstriert Kontrastmittelgefüllten Seitenventrikel (roter Pfeil).

Als weitere diagnostische Möglichkeit erlaubte die dreidimensionale Rekonstruktion der μ CT-Schichtaufnahmen eine Visualisierung des arteriellen und des venösen Gefäßsystems durch unterschiedliche Farbkodierung der ab- und zuführenden Blutgefäße (Abbildung 7).

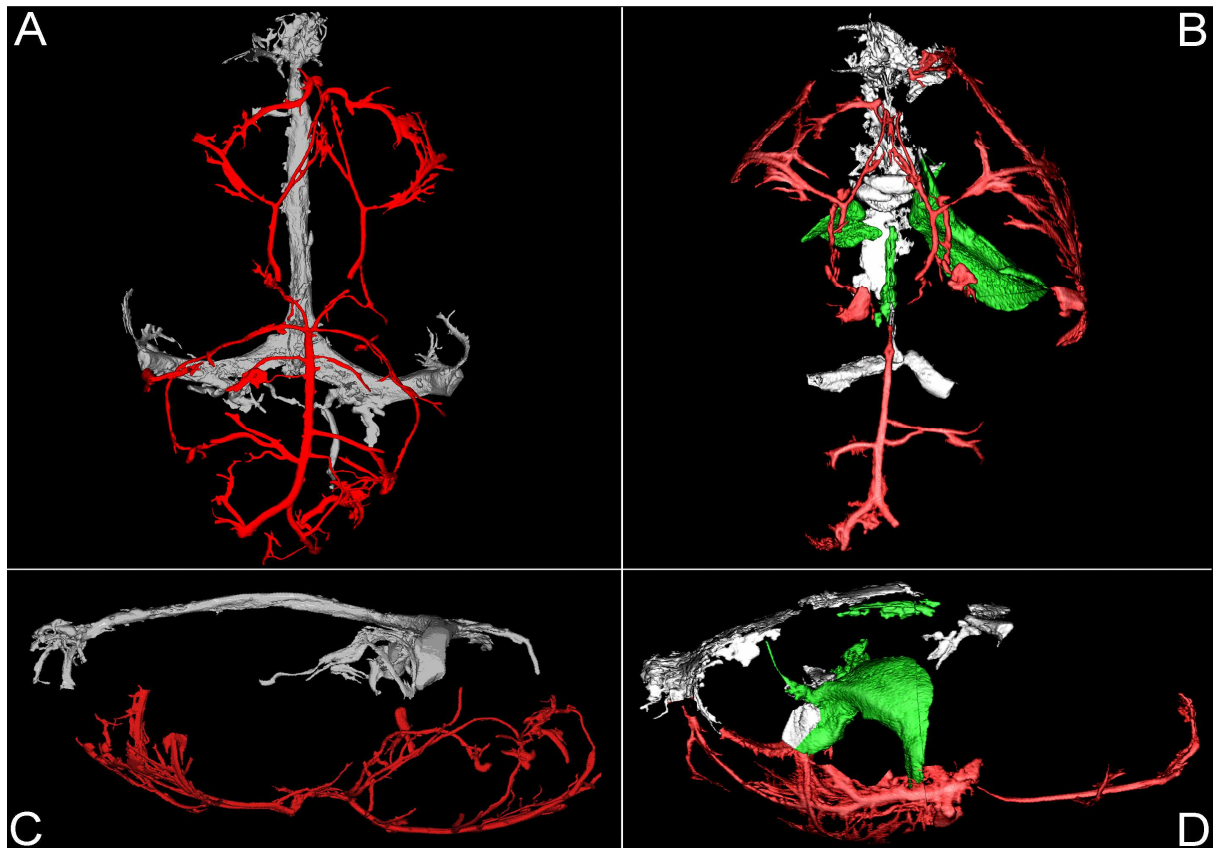


Abbildung 7. Rekonstruktion des arteriellen (rot) und venösen (weiss) Gefäßvolumens in den Kontrollen (axial, A; sagittal, C) und nach SSS Thrombose (axial, B; sagittal, D) Microfil Leakage im Seitenventrikel (B, D, grün).

Abgesehen von der Möglichkeit einer grundsätzlichen visuellen Darstellung des arteriellen und venösen Gefäßsystems kann auch das intraluminale Kontrastmittelvolumen des arteriellen und venösen Gefäßsystems unabhängig voneinander quantifiziert werden. (Abbildung 7 u. 8). Durch die Thrombosierung des SSS wurde die Volumenfraktion des venösen Gefäßsystems im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert (von $24,7 \pm 0,86$ auf $3,6 \pm 0,88$ mm^3 ($p < 0,001$), aber nicht das arterielle Gefäßvolumen ($23,1 \pm 0,87$ vs $22,7 \pm 0,9$ mm^3 ; $p < 0,19$), (Abbildung 8).

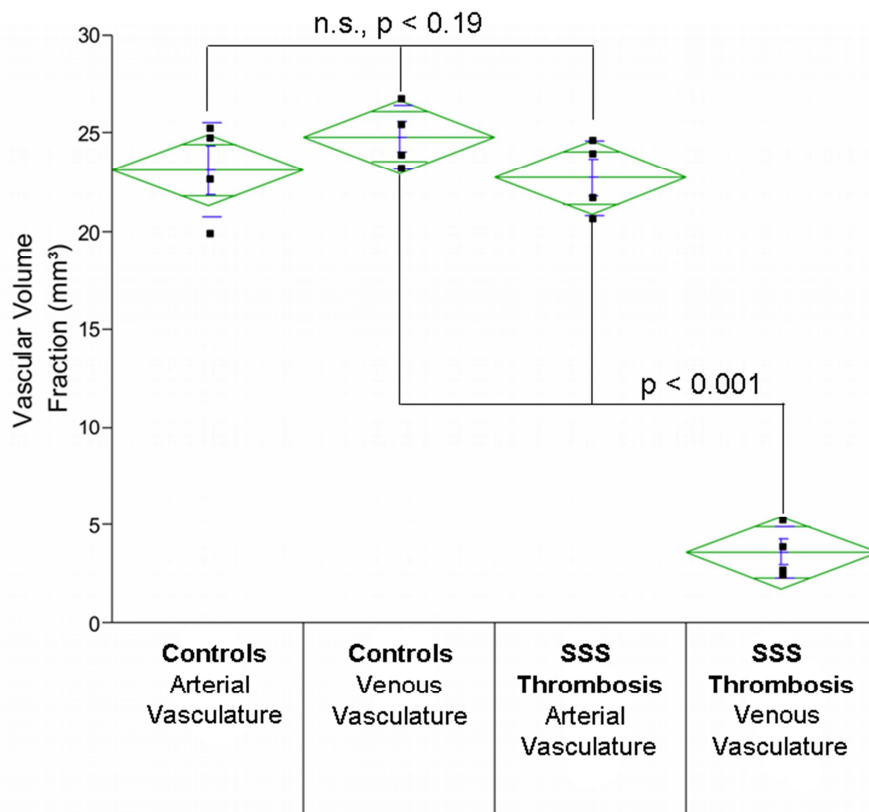


Abbildung 8. Signifikante Abnahme der vaskulären Volumenfraktion in der SSS Thrombose Gruppe ($p < 0.001$) verglichen mit Kontrolltieren.

3.2 Ergebnisse der 2. Untersuchung:

3.2.1 Mikro-Computertomographie

In der Abbildung 5 sind jeweils ein makroskopisches Präparat als Kontrolle unmittelbar nach Kontrastmittelperfusion, ein Präparat der Gruppe I und ein Präparat der Gruppe II dargestellt. Korrespondierend hierzu ist das Gefäßsystem in der Maximum-Intensity Projektion und koronare Anschnitte zum direkten Vergleich angefertigt. Während die Sinus bei den Kontrolltieren kontinuierlich ohne Aussparung mit Kontrastmittel gefüllt sind, zeigt sich der SSS im Präparat der Gruppe I und II des Experiments 2 makroskopisch und mikro-computertomographisch verschlossen. In

der Gruppe I zeigen sich die Brückenvenen unmittelbar ab dem Grenzbereich zum thrombosierten Sinusareal erweitert und implizieren verglichen mit den Bildern der Gruppe II, die keine Kongestion, sondern eine Zunahme an kleinen Gefäßen sowie Rückgang des Gefäßdurchmessers zeigen, zu der Annahme, dass sich hier ein kollateralisierendes Drainagesystem gebildet haben muss. Die Thrombose des Sinus sagittalis superior, sechs Stunden nach Induktion, führte zu einer Kongestion der Brückenvenen (Bild 2). Nach sechs Wochen konnte bereits im Mikro-CT ein Netzwerk kleiner neuer irregulär verlaufender Gefäße dargestellt werden, welches sich um den verschlossenen Sinus gruppiert und mit den kortikalen Venen in Verbindung steht (Bild 5). Dies galt es nun im nächsten Schritt in einem weitaus kleineren Größenbereich (nm) im Nano-CT (Voxelgröße 900 nm^3) darzustellen und im synchrotron-basiertem Mikro-CT (Voxelgröße $1,9 \text{ }\mu\text{m}^3$) die Ursprünge und Ansätze der neu gebildeten Gefäße zu demonstrieren.

3.2.2 Nano-Computertomographie

In der Gruppe I führte die SSS Thrombose zu einer Kongestion der Brückenvenen im unmittelbaren Grenzbereich zum Thromboseareal am SSS (Durchschnitt der Brückenvenendurchmesser: Kontrollen $47,7 \pm 1,4 \text{ }\mu\text{m}$ versus Gruppe I $129,3 \pm 3,9 \text{ }\mu\text{m}$, $p < 0,001$); In der Gruppe II war der Durchmesser der Brückenvenen wieder auf dem Niveau der Kontrollgruppe (Gruppe II $52,1 \pm 1,4 \text{ }\mu\text{m}$, $p = 0,21$) (Abbildung 10). Die akute Thrombose (Gruppe I) führte zu einer signifikanten Reduktion der perfundierten Gesamtquerschnittsfläche im Bereich des okkludierten SSS (Kontrollen $0,61 \pm 0,008 \text{ mm}^2$ versus Gruppe I $0,003 \pm 0,003 \text{ mm}^2$, $p < 0,0001$, Abbildung 9 u. 10), während sich die Querschnittsfläche der Mikrogefäße in der Gruppe II gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte (Gruppe II $0,79 \pm 0,02 \text{ mm}^2$, $p < 0,001$, Abbildung 10). Dies lässt sich durch eine große Anzahl von kleinsten Gefäßen paraluminal des okkludierten SSS erklären (Abbildung 9). Wird der Volumenanteil betrachtet, kann in der Gruppe I infolge der venösen Kongestion der Brückenvenen ein deutlicher, signifikanter Anstieg des Gesamtvolumens im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden (Kontrollen $0,37 \pm 0,01 \text{ mm}^3$ versus Gruppe I $0,62 \pm 0,01 \text{ mm}^3$, $p < 0,001$, Abbildung 10). Korrespondierend konnte auch histologisch die Zahl der kleinen kortikalen Venen in der Gruppe II beobachtet

werden (Abbildung 9). Auch die Querschnittsfläche war nach 6 Wochen normalisiert. Dies wurde durch quantitative nano-CT (Abbildung 10) bestätigt. Auch in der Gruppe II war der Volumenanteil der kortikalen Venen deutlich größer als in der Kontrollgruppe (Gruppe II $0,40 \pm 0,06 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$), was nicht mit einer Stauung, sondern nunmehr mit einer erhöhten Anzahl von kleinen Gefäßen einherging (Abbildung 9, 10). Bei allen Tieren konnten große transkorticale Kollateralvenen nachgewiesen werden, die in diesem Ausmaß in der Kontrollgruppe nicht sichtbar waren (Abbildung 9).

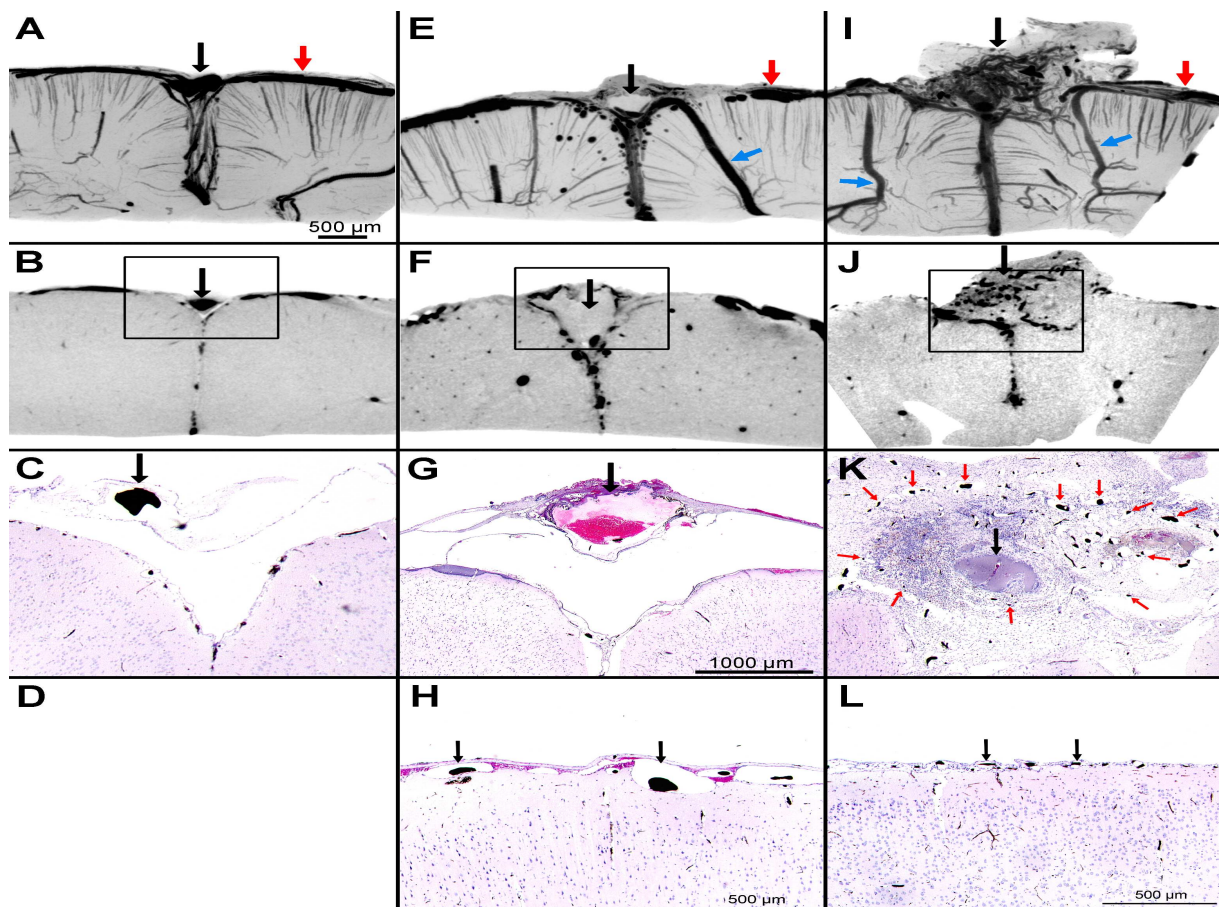


Abbildung 9. Nano-Computertomographie und Histologie. Obere Reihe (A, E, I): Coronale nano-CT MIP. Der schwarze Pfeil zeigt den sinus sagittalis superior (SSS), roter Pfeil zeigt auf die Brückenvenen. Zweite Reihe (B, F, J): Coronare nano-CT Bilder. Dritte Reihe (C, G, K): entsprechende HE Färbung der Region im Viereck aus Reihe zwei. Der schwarze Pfeil zeigt auf den SSS, der rote Pfeil zeigt auf die scheinbar neu gebildeten Gefäße. Untere Reihe (D, H, L): Schnitt durch den parasagittalen Cortex. A-D: Kontrollen. E-H: Ergebnisse 6 h nach Thromboseinduktion, achte auf transkorticale Kollaterale (blauer Pfeil) und kortikale venöse Kongestion (H). I-L: Situation 6 Wochen nach Thromboseinduktion. Achte auf das Netzwerk kleiner Gefäße im Bereich des SSS, welche offenbar kleine Venen darstellen (rote Pfeile, K). Beachte die normal großen kortikalen Venen (Pfeile, L).

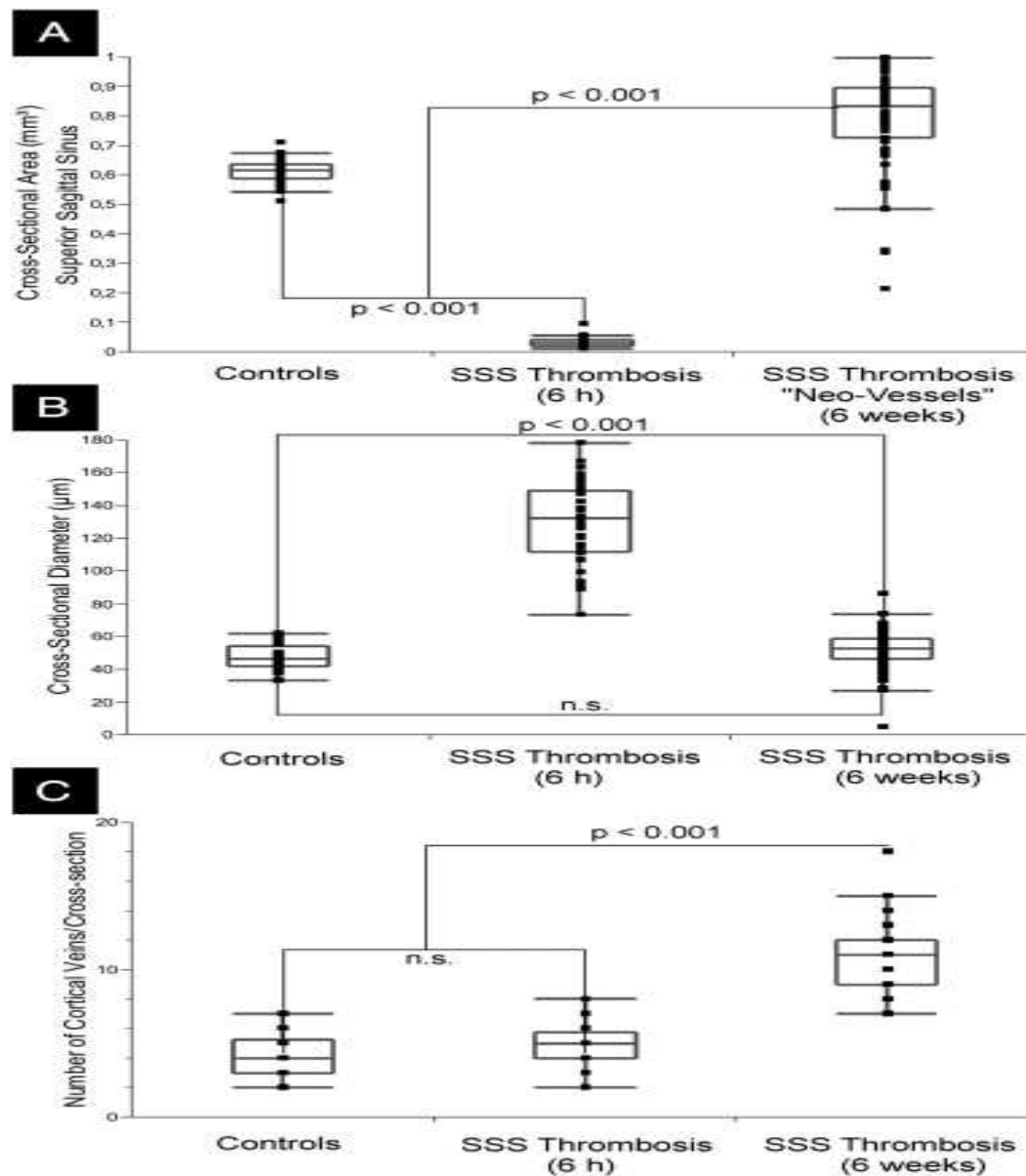


Abbildung 10. Quantitative Nano-Computertomographie. A: Quantitative Nano-CT. (A) Box-Plot der Querschnittsfläche (mm²) des perfundierten SSS in Kontrollen und nach Thrombose. (B) Box-Plot der Querschnittsfläche von Brückenvenen. (C) Box-Plot der Anzahl an kortikalen Venen pro Querschnitt.

3.2.3 Synchrotron-basierte Mikro-Computertomographie

Im synchrotron-basierten Mikro-CT konnte ein Netzwerk von kleinsten Gefäßen nach 6 Wochen SSS Thrombose dargestellt werden. Das Gefäßnetzwerk im Bereich des paraluminalen okkludierten SSS nach 6 Wochen zeigte einen direkten Übergang in

die kortikalen Brückenvenen und beweist somit die Neoangiogenese/ „Venogenese“ und das Bestehen einer Kollateralisierung.

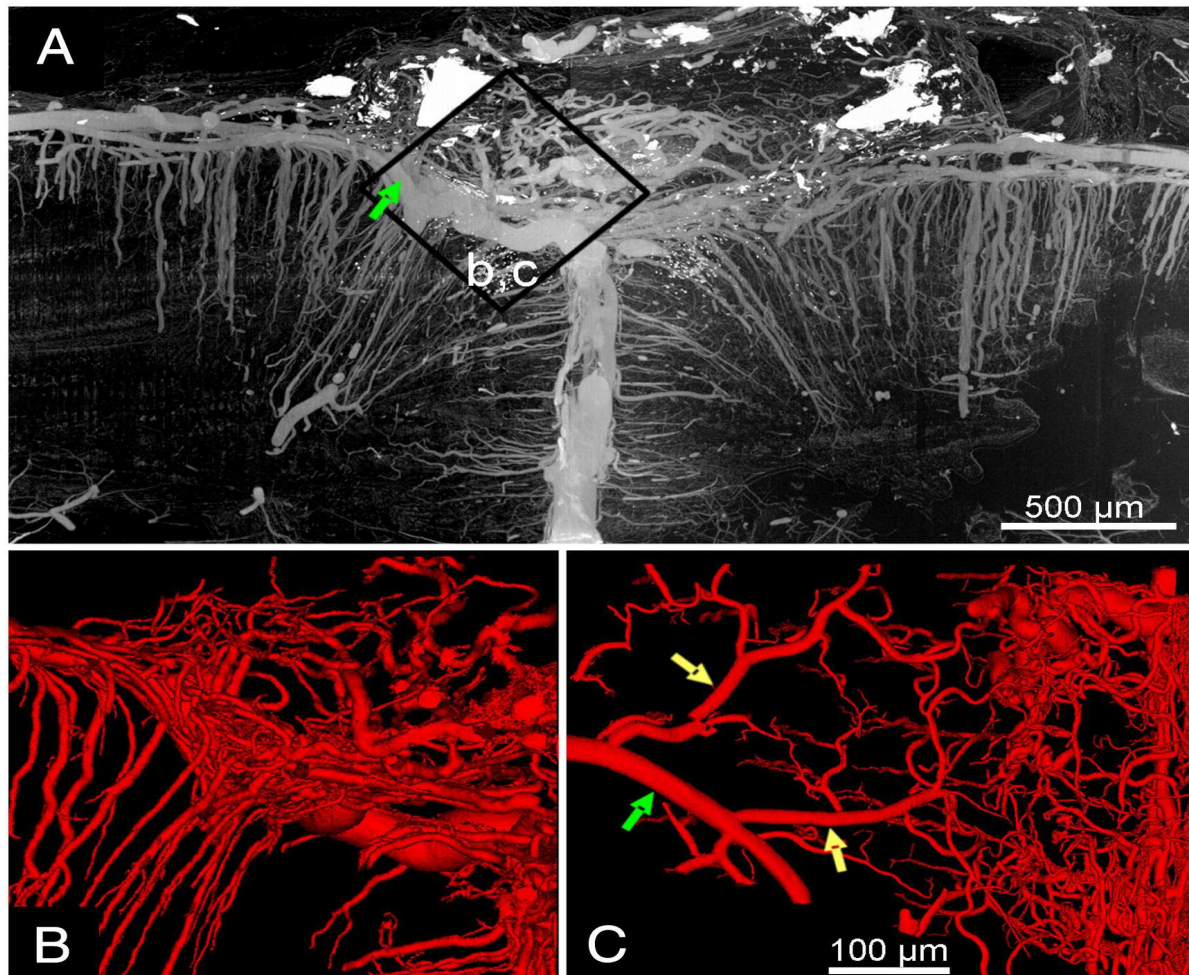


Abbildung 11. Synchrotron-basierte Mikro-CT. (A) Dreidimensionale Darstellung des vaskulären Netzwerkes im SSS 6 Wochen nach Thrombose (grüner Pfeil: kortikale Vene). (B und C) Verschiedene räumliche Projektionen zeigen Verbindung des mikrovaskulären Netzwerkes mit kortikalen Venen (grüner Pfeil: kortikale Vene, gelbe Pfeile: aussprossende Venen, die neu geformte Mikrogefäße verbinden).

3.2.4 Histologie

Die histologischen Bilder in Abbildung 9 und 12 zeigen, dass auch nach der Probenpräparation mit Mikrofil-Kontrastmittel und dem Scan in der Mikro-CT und Nano-CT, es noch problemlos möglich ist von den Proben histologische Schnitte

anzufertigen und diese dann nach den bekannten Methoden zu bearbeiten. Der Scan zerstört das Gewebe nicht und es gibt daher keine Einschränkungen bei späteren morphologischen oder immunhistochemischen Untersuchungen der Proben. Auch auf diesen Bildern erkennt man den okkludierten SSS nach der Thromboseinduktion und v.a. den höheren Gefäßanteil in der Gruppe II. VEGF-Expression ließ sich über dem thrombosierte SSS beobachten; mit der höchsten Expression nach 6 Wochen, was mittels quantitativer reverse-transkriptase-PCR bestätigt werden konnte. In den Kontrollen war nur eine minimale VEGF-Expression zu beobachten.

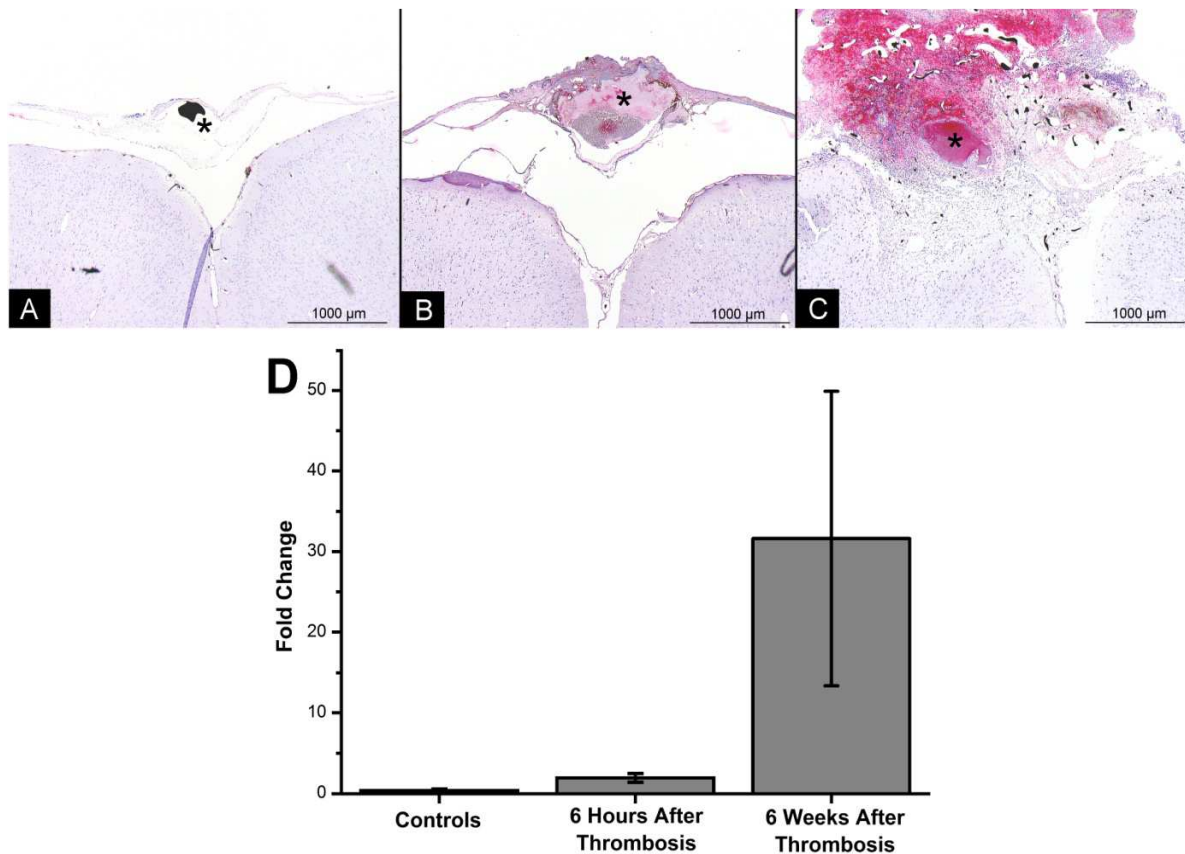


Abbildung 12. Vascular endothelial growths factor, Immunhistochemie und quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion. Obere Reihe: Immunhistochemie der Kontrolltiere (A), Gruppe I (B), und Gruppe II (C) nach Thromboseinduktion zeigen die VEGF Reaktion im SSS Bereich. D: quantitative RT- PCR mit der höchsten Expression von VEGF nach 6 Wochen (Gruppe II).

3.2.5 Rotarod-Test:

Das Testergebnis des Rotarod-Tests wies keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede auf. Es lagen keine Hinweise auf ein gestörtes Gleichgewicht oder gestörtes motorisches Verhalten vor.

3.2.6 Neurologischer Defizit Score

Die Auswertung der neurologischen Beurteilung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe. In der Auswertung der einzelnen Items des Neuro Scores zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

4. DISKUSSION

4.1. Klinisches Krankheitsbild

Die SHVT betrifft insbesondere Kinder und junge Erwachsene, kommt aber potenziell in allen Altersgruppen vor. Aufgrund spezifischer Prädispositionen wie der Einnahme von Kontrazeptiva, Schwangerschaft und Wochenbett trifft die SHVT vornehmlich bei Frauen mit einer Häufigkeit von etwa 75 % auf (Ferro et al. 2004, Cantu et al. 1993). Weitere häufige Risikofaktoren sind angeborene und erworbene Thrombophilien. Die Liste gesicherter oder prädisponierender Ursachen mit z.B. Infektionen im HNO-Bereich, Dehydratation, Schädelhirntraumata, Meningeomen, Gefäßmalformationen ist sehr lang. Insgesamt ist die Ätiologie der SHVT oft multifaktoriell und trotz einer großen Anzahl manifester Ursachen in ca. 20-30 % der Fälle ungeklärt. Im Gegensatz zu typischen arteriellen Thromben, die plötzlich zu Gefäßverschlüssen führen und häufig je nach betroffenem Gefäß klar definierte klinische Symptome verursachen, beginnen 1/3 der venösen Thromben chronisch, 1/3 subakut und 1/3 akut durch ein gestörtes Gleichgewicht von zeitgleich ablaufenden prothrombotischen und thrombolytischen Prozessen. Der intravasale Thrombus

weist in der Frühphase eine laminierte Struktur mit Lagen aggregierter und degranulierter Thrombozyten mit Infiltration von Leukozyten und Lagen von Fibrin auf. Nach 5 bis 10 Tagen nimmt der Thrombus eine homogene, hyaline Struktur an. In einem späteren Stadium (8 bis 20 Tage) kommt es zu einer Organisation des Thrombus mit Einsprossen von Fibroblasten und Kapillaren sowie endothelbedeckter Spaltbildungen durch Thrombusretraktion. Im Verlauf wird der Thrombus zu einer vaskularisierten, fibrösen Masse umgebaut, die durch Thrombusretraktion zu einer teilweisen Rekanalisierung führen kann (Cervos-Navarro & Kannuki 1990, Cervos-Navarro, Kannuki & Matsumoto 1994). Bei symptomatischen Patienten sind am häufigsten der SSS, Sinus transversus sowie der Sinus sigmoidei betroffen, während Thrombosen der kortikalen Venen und der inneren Hirnvenen seltener auftreten (Bousser 2007). Die Bildung von venösen Thromben führt insbesondere bei Ausbreitung in Brückenvenen und kortikale Venen zu einem Abfall des zerebralen Perfusionsdruckes und gleichzeitig zu einem steigenden intrakraniellen Druck. Infolgedessen nimmt der zerebrale Blutfluss lokal ab, was zur Ausbildung eines zytotoxischen Ödems führt und konsekutiv zu venösen Stauungsinfarkten führen kann. Nach Störung der Blut-Hirn-Schranke und erhöhter kapillärer Filtration kommt es zu einem vasogenem Ödem und infolgedessen zu Entstehung von Stauungsblutungen. In der im Jahre 2004 veröffentlichten „International Study on Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis (ISCVT)“ mit einer Kohortengröße von 624 Patienten zeigte sich, dass die Letalität der Erkrankung deutlich unter 10 % liegt und abhängig war von unilateralen großen Parenchymblutungen mit konsekutivem diffusem Hirnödem. Bei 79 % der Patienten kam es am Ende der im Mittel 16-monatigen Verlaufsbeobachtung zu einer kompletten Erholung. Ein nur geringer Prozentsatz der Patienten war am Ende der Beobachtungsphase behindert und im Alltag von Hilfe abhängig. Als prognostisch ungünstige Zeichen ließen sich ein Alter > 37 Jahre, männliches Geschlecht, neuropsychologische Defizite, eine klinisch tiefe Bewusstseinsstörung bei Aufnahme (GCS <9) sowie eine Thrombose der inneren Hirnvenen identifizieren. Die Gesamtsterblichkeit war bei der Altersgruppe > 65 Jahre mit etwa 27 % deutlich höher als bei der Altersgruppe < 65 Jahre (7%) (Ferro et al. 2004). Die Rezidivrate ist sehr gering und liegt bei etwa 2 % pro Jahr, vergleichbar mit der Rezidivrate bei tiefen Beinvenenthrombosen (Ferro et al. 2004, Gosk-Bierska et al. 2006).

Die klinische Symptomatik bei SHVT ist sehr variabel und weist eine chronische bis

perakute Dynamik auf. Die Symptomausprägung geht von asymptomatisch über isolierten Kopfschmerz bis hin zum Koma. Der Kopfschmerz ist mit ca. 90 % das häufigste Symptom der SHVT (Bousser 2007). Neben Kopfschmerzen treten Krampfanfälle und fokale neurologische Defizite auf, in 20- 40 % der Fälle manifestiert sich das Syndrom einer isolierten intrakraniellen Drucksteigerung mit Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen sowie einer bilateralen Stauungspapille (Biousse et al. 1999). Schließlich kann es auch passend zu einer Thrombose der inneren Hirnvenen mit bilateraler Einbeziehung der Thalami zu initialer Bewusstseinstörung bis hin zum Koma kommen.

4.2 Pathophysiologie

Die pathophysiologischen Vorgänge im Rahmen einer Hirnvenen- und Sinusthrombose sind komplex und noch nicht vollständig bekannt. Die Schwere der klinischen Symptomatik scheint nicht mit dem Ausmaß der SHVT zu korrelieren. Wie Röttger et al. 2005 zeigen konnten, kommt es bei mehr als der Hälfte der Patienten mit venösen Stauungsinfarkten zu einer kompletten Rückbildung oder deutlichen Verminderung des Läsionsvolumens. Dieser Rückgang geschieht schneller bei Patienten, die eine rasche Rekanalisation der betroffenen Sinus nach MRT-Kriterien aufweisen, hängt aber im Endzustand nicht von Rekanalisation oder von einem persistierendem Verschluss selbst ab. Klinisch besteht auch kein Unterschied im Verlauf der Erkrankung in Abhängigkeit von Rekanalisation oder persistierendem Verschluss (Stolz et al. 2004). Dies lässt den Schluss zu, dass offensichtlich eine Adaptation der Kollateralen im Verlauf stattfindet oder Angiogenese oder beides. Die hier untersuchten Gefäße bzw. neu gebildeten Gefäße liegen in einer Größenordnung, die durch gängige bildgebende Verfahren beim Menschen nicht dargestellt werden können. Die Sektion von an Sinusthrombosen verstorbener Patienten erfolgt zu selten, als dass hieraus systematische Erkenntnisse gewonnen werden könnten. Außerdem ist eine Standardisierung der Lokalisation und des Zeitpunkts der venösen Thrombose notwendig, um die dadurch ausgelösten Veränderungen im Gefäßsystem auch wissenschaftlich bewerten zu können.

4.3 Tiermodelle zur Sinusthrombose

Um die pathophysiologischen Vorgänge bei SHVT zu untersuchen wurden bisher bereits einige tierexperimentelle Methoden etabliert. Im Gegensatz zum ischämischen, arteriellen Hirninfarkt existieren nur wenige tierexperimentelle Untersuchungen zur Hirnvenen- und Sinusthrombose.

Die wenigen berichteten Untersuchungen wurden an Ratten, Hamstern, Katzen, Kaninchen und bei Schweinen durchgeführt. An diesen Modellen wurde die Änderung der regionalen zerebralen Hirndurchblutung (rCBF) mit der Laser-Doppler-Flowmetrie oder der Hydrogen Clearance Methode bestimmt. Weitere in diesen Modellen verwendete Techniken bestanden in der oximetrischen Messung der regionalen Sauerstoffsättigung, der Messung des intrakraniellen Drucks mittels Parenchym- und Ventrikelsonden und der Fluorescein Angiographie zum Nachweis einer Blut-Hirn-Schrankenstörung. Alle bisherigen Untersuchungen nutzten die Möglichkeit einer histopathologischen Aufarbeitung.

Diese Methoden stellten größtenteils invasive Eingriffe dar und führten nicht selten zu iatrogenen Parenchymdefekten am Gehirn. Darüber hinaus waren diese Methoden nur begrenzt übertragbar, da die Thrombosedauer oder die Rekanalisation nicht beeinflussbar waren. Einen permanenten Verschluss mit Beobachtung der Klinik oder Veränderungen der Gefäßarchitektur über sieben Tage hinaus konnte keiner dieser Tiermodelle nachweisen. Sämtliche Tiermodelle hatten Komplikationen wie Stauungsinfarkte, Hirnödeme nach sich gezogen. Die Untersuchung zur Wirksamkeit von Therapiemöglichkeiten und Bewertung derselben war nur eingeschränkt möglich. Angiogeneseuntersuchungen wurden bisher nur bei Tiermodellen der arteriovenösen Fisteln (Rothbart et al. 1996, Terada et al. 1996, Shin et al. 2007), die u.a. durch operative Anastomisierung der A. carotis und der V. jugularis teilweise mit der Induktion einer Sinusthrombose geschaffen wurde.

Verschiedene Formen zur Thromboseinduktion wurden durchgeführt. Wang et al (2010) induzierten die Sinusthrombose mit invasiver kathetergestützter Thrombininjektion und Ballondilatation bei Schweinen und beobachteten die Effekte dieser Thrombose über sieben Tage, während ein Tier verstarb und 4 verschlossene SSS aufwies. Komplikationen im Sinne eines Hirnödems, hämorrhagischer Infarkte konnten mittels MRT dargestellt werden. Stracke et al verwendeten humane

Blutkoagel bei Schweinen und untersuchten diese mittels MR Bildgebung, Schaller et al. induzierten eine Sinusthrombose mit Ligatur des posterioren Anteils des Sinus sagittalis superior (SSS) bei der Katze (2003), Röttger et al. (2005) mit topischer Applikation von Eisen-III-Chlorid bei Ratten. Eisen-III-Chlorid wurde zuerst von Kurz et al. angewendet und im Zusammenhang mit Modellen der arteriellen Thrombosebildung beschrieben(1990). Des Weiteren wurden weitere Modelle mit Okklusion des SSS oder der kortikalen Venen durch lokale Injektionen von thrombogenem Material wie Cyanoacrylat (Kurz, Main & Sandusky 1990) oder Kaolin-Cephalin (Röther et al. 1996, Ungersböck, Heimann & Kempfski 1993) durchgeführt. Während sämtliche o.e. Modelle ein meist reversibles Modell darstellten und die Beurteilbarkeit der Klinik, Diagnostik sowie Anwendungen von Therapiemöglichkeiten begrenzt erscheinen ließen, zeigt unser Modell einen dauerhaften Verschluss des SSS über eine Zeitdauer von sechs Wochen am lebenden Tier und erlaubt pathophysiologische Zusammenhänge nach permanentem Verschluss über längere Zeit zu untersuchen.

4.3.1 Modifikation des SSS Thrombosemodells

Zur genaueren Untersuchung der Adaptationsprozesse nach SHVT modifizierten wir das von Röttger et al. etablierte Tiermodell an der Ratte und induzierten erstmalig einen permanenten Verschluss des SSS über einen Zeitraum von sechs Wochen und führten die entnommenen Gehirne einer dreidimensionalen Darstellung mittels hochauflösender Mikro-CT und Nano-CT zu und verglichen die Ergebnisse mit den gängigen histologischen Untersuchungen.

Das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Tiermodell an der Ratte hat sich überaus bewährt und besitzt den wesentlichen Vorteil, dass es die Situation am Menschen sehr eng widerspiegelt, die Tiere aber ohne Schmerzen und ohne wesentliche funktionelle Einschränkungen überleben, was mit anderen Modellen bisher nicht möglich war. Um einen permanenten Verschluss zu induzieren, erfolgte eine topische Applikation mit dem Eisen-III-Chlorid über 5 Minuten. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Durch die lokale Behandlung des freiliegenden SSS mit Eisen-III-Chlorid wird eine räumlich definierte Gefäßläsion gesetzt, wodurch es zur Zerstörung der intimalen Endothelschicht durch Bildung freier Radikale kommt.

Die somit entstandenen subendothelialen Strukturen induzieren eine Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung in vivo; dieser Thrombus besteht aus Fibrin, aktivierten Thrombozyten und eingeschlossenen Erythrozyten.

Die SSS Thromboseinduktion mittels Eisen-III-Chlorid ist weniger invasiv, durch das Auflegen eines mit Eisen-III-Chlorid getunkten Filterpapierstreifens in vorgegebener Zeit unmittelbar über dem freipräpariertem SSS bei erhaltener Dura wird eine Schädigung der Kortexvenen sowie des Hirnparenchyms verhindert.

Lediglich die Kraniotomie über der Fissura sagittalis bis zur Freilegung des intakten SSS stellt den wenig invasiven Charakter unseres Modells dar. Das Modell ist reproduzierbar, einfach durchzuführen und insbesondere nicht-tödlich. Keines der Tiere in unserem Projekt verstarb vor dem Studienende. Die Dura blieb intakt. Durch regelmäßige Messung normaler Temperaturen, unauffälliger Untersuchung nach dem Neuroscore und Rotarod stellt unser Modell eine nebenwirkungs- und komplikationsarme Methode dar. Zudem erlaubt unsere Methode eine systematische Untersuchung von therapeutischen Ansätzen im Sinne einer Behandelbarkeit oder Rekanalisierbarkeit durch pharmakologische Substanzen.

Bei der unauffälligen klinischen Untersuchung nach dem Neuroscore sowie der vergleichbar unveränderten Leistung im Rotarod-Test während der 6 Wochen ist davon auszugehen, dass sich weder Stauungsinfarkte noch eine größere hypoxische Hirnschädigung ereignet haben, hierzu wäre sicherlich eine Darstellung des Gehirnes im MRT eine ergänzende Bereicherung der Studie gewesen, zumal davon ausgegangen werden kann. Des Weiteren konnte als weiterer Nachteil unserer Studie der cerebrale Blutfluss nicht gemessen werden.

4.4 Mikro- und Nano-Computertomographie

Die Technologie der Micro- Computertomographie gewann im letzten Jahrzehnt zunehmende Bedeutung in der ex-vivo Forschung. Mit ihrer Hilfe ist die Akquisition eines isotropen, dreidimensionalen Bilddatensatzes mit räumlicher Auflösung bis zu 10 μm möglich. Erste Anwendungsmöglichkeiten waren im Rahmen der Osteoporoseforschung die Morphometrie des spongösen Knochens. Das

Anwendungsspektrum ist inzwischen ausgeweitet. Ritman et al. konnten neben dreidimensionaler Darstellung und Vergleichsanalyse mit der konventionellen Histologie erstmals Struktur-Funktionsbeziehungen von nutritiven Gefäßen und dem physiologischen Knochenremodeling in der Mikro-CT darstellen(1998). Vaskuläre Kontrastmittel und neuere Perfusionstechniken erlauben die Evaluierung der Gefäßarchitektur zahlreicher Organe. Seit über 20 Jahren konnte durch die Verwendung von Microfil-Kontrastmittel eine lückenlose und homogene Perfusion des arteriellen Gefäßsystems in unterschiedlichen Organen dargestellt werden. Das aus den Komponenten Blei und Silikon bestehende und in wäßriger Lösung vorliegende Microfil nimmt 20 Minuten nach Vermischung eine vollständig und gleichmäßig verhärtete Viskosität an. Das Microfil lässt sich problemlos in die Gefäße injizieren und sich bis in die Kapillaren verteilen. Durch die Akquisition eines lückenlosen, dreidimensionalen Datensatzes ermöglicht die μ CT, neben der Gewebedifferenzierung, eine Quantifizierung des Kontrastmittelperfusates, womit Aussagen zur Gefäßdichte, zur Gefäßoberfläche und zum Gefäßvolumen getroffen werden können. In der μ CT erzeugte, isotrope Datensätze werden anschließend durch Referenztechniken, wie beispielweise die quantitative Histologie verifiziert. Dabei zeigt sich eine hohe Korrelation im Vergleich zwischen den etablierten histologischen Verfahren und der μ CT. Mit der standardisierten Histomorphometrie erfolgt die Darstellung und quantitative Auswertung von kleinen Strukturen bis zu einer Größe von unter 200 μ m. Bestandteil der Untersuchungen sind hauptsächlich die Darstellung von Wanddicke, Lumenweite, Endotheloberfläche, Stenosegrade, Plaquemorphologie ohne jedoch aufgrund der insgesamt kleineren Größe des Untersuchungsmaterials die Kontinuität und mögliche Heterogenitäten stenosierender Läsionen zuverlässig erfassen zu können. Diese Lücke wird durch Interpolation geschlossen und hinsichtlich Dimension des Gefäßes oder eines bestimmten Gefäßanteils Rückschlüsse gezogen. Ein weiterer Nachteil ist die Zeit und personalintensive Probenaufbereitung.

Ein Nachteil der Mikro-CT ist die Begrenzung des Messfeldes auf kleine Volumina, je nach Auflösung von einigen mm^3 bis zu wenigen cm^3 . Derzeit ist die Auflösung durch die Zahl der Pixel der CCD-Kamera noch limitiert (1024x1024), so dass eine Auflösung von nur etwa einem Tausendstel des größten Objektdurchmessers in der Ebene senkrecht zur Drehachse der Probe erreicht werden kann.

Ein weiterer Nachteil liegt in der Notwendigkeit der Kontrastmittelapplikation, um eine

Kontrastverstärkung und damit eine bessere Gewebedifferenzierung zu erreichen. Damit lassen sich bisher lediglich ex-vivo Untersuchungsmöglichkeiten durchführen, sowohl aufgrund der Probengröße als auch hinsichtlich Polymerisierung der bisher eingesetzten Kontrastmittel.

4.4.1 Mikro- und Nano-Computertomographie im Sinusthrombosemodell

Die Magnetresonanztomographie (MRT) stellte bisher in den einigen Tiermodellen zur Abbildung der SSS Thrombose die bildgebende Diagnostik der Wahl dar. Der wichtigste Vorteil dieser Methode ist der nichtinvasive Charakter, die Möglichkeit einer wiederholten in-vivo Bildgebung. Neben Parenchymläsionen konnte allerdings bei begrenzter Ortsauflösung nur die Beurteilung der größeren Sinus und Hirnvenen jedoch nicht der kleineren kortikalen Venen oder eventueller neugebildeter Kapillaren erfolgen.

Ausgehend von früheren Arbeiten mit der 3D- Micro-Computertomographie (Jorgensen, Demirkaya & Ritman 1998, Langheinrich et al. 2004, Lerman & Ritman 1999, Kantor et al. 2002) als ergänzendes und alternatives Verfahren zur 2 D quantitativen Histomorphometrie zur Durchführung von Strukturanalysen in zwei- und dreidimensionaler Ebene untersuchten wir eine mögliche Angiogenese nach permanentem Sinusverschluss mit Mikro- und Nano-CT. Auch wenn die Histologie nach wie vor den Goldstandard in der Gefäßanalyse darstellt, sind mit dieser Methode lediglich zweidimensionale Untersuchungen möglich. Die Mikro-Computertomographie erlaubt hingegen komplette dreidimensionale Datensätze des Untersuchungsmaterials. Mit Hilfe der Mikro-CT und Nano-CT konnten wir auch im SSS Modell einen kompletten dreidimensionalen Datensatz erstellen und somit erstmalig eine kontinuierliche, quantitative und qualitative Darstellung der Gefäßarchitektur nach SSS Thrombose visualisieren. Anschließend war es durch eine zerstörungsfreie Untersuchung im Mikro-CT möglich, die Proben weiteren histologischen und immunhistologischen Untersuchungen zuzuführen.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Mikro- und Nano-CT nach Induktion einer Thrombose des Sinus sagittalis superior (SSS) bei 4 Ratten speziell für unsere Fragestellung evaluiert. Nach Kontrastmittelperfusion wurden die Gehirne

entnommen und der Mikro-CT Bildgebung zur dreidimensionalen Erfassung der zerebralen Angioarchitektur zugeführt. In allen Proben der Kontrollgruppe konnte eine nahezu komplette kontinuierliche Füllung des arteriellen und venösen Gefäßsystems ohne Aussparung erzielt werden, während die Tiere der Gruppe I einen okkludierten SSS aufwiesen. In der Abbildung 4 wird makroskopisch (A und B) sowie ein Mikro-CT Nativbild (C) und die Rekonstruktion des arteriellen Gefäßsystems mit Beschreibung der einzelnen Arterien (D) dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildgebung mittels Mikro-CT von einem venösen Gefäßverschluss betroffene Bereiche akkurat abbilden und von nicht infarziertem Gewebe gut differenzieren kann. Darüber hinaus konnten durch die 3D-Mikro-CT neben der umfassenden dreidimensionalen Darstellung thrombosebedingter Komplikationen (z.B. Ventrikelblutung) auch Informationen über die arterielle und venöse Volumenfraktion gewonnen werden. Die Nano-Computertomographie ermöglichte die Darstellung von Anzahl und Querschnitt verschlossener sowie mit Kontrastmittel perfundierter Venen. Zum Einen konnten also sowohl Persistenz als auch hämodynamische Konsequenzen des Sinusverschlusses in diesem Tiermodell bildgebend belegt werden, zum anderen erwiesen sich hier Mikro- und Nano-CT als adäquate, durchführbare und aussagekräftige bildgebende Verfahren. Hierbei können diese eine Ergänzung der MRT-Bildgebung und der histologischen Aufarbeitung darstellen.

Im Vergleich zur konventionellen Histologie erlaubt die Methode eine exakte Quantifizierung des Gefäßbaums in einem dreidimensionalen Hirnvolumen.

4.5 Angiogenese

Angiogenese war bisher nur Untersuchungsgegenstand in Tiermodellen der arteriovenösen Fistel, die durch operative Anastomosierung der A. carotis und der Jugularvene z.T. in Kombination mit der Induktion einer Sinusthrombose geschaffen wurde. Diese Untersuchungen sind aber hinsichtlich der Frage der zerebralen Angiogenese auf Sinusthrombosen nicht übertragbar.

Im Rahmen von Untersuchungen zur Angiogenese bei SHVT wurde bereits eine Expression von Vascular Endothelial Growths Factor (VEGF) im Thrombus selbst

und im angrenzenden Kortex tierexperimentell nachgewiesen (Kimura et al. 2005). Dies passt zu den älteren Beobachtungen am Menschen, die eine Organisation und Teilrekanalisation des Thrombus im Verlauf von Wochen beschreiben (Cervos-Navarro & Kannuki 1990, Cervos-Navarro, Kannuki & Matsumoto 1994). Röttger et al. konnten tierexperimentell nachweisen, dass sowohl im Spontanverlauf als auch modifiziert durch eine thrombolytisch/antithrombotische Therapie eine Angiogenese auch entfernt vom Thrombus im Kortex nach 7 Tagen stattfindet (bisher nicht veröffentlichte Daten, Röttger). Worauf diese beruht, ob sie VEGF vermittelt ist, in welchem zeitlichen Rahmen sie verläuft und ob sie tatsächlich zu einem funktionell verbesserten Verlauf führt ist noch nicht bekannt und verleitete uns zu Untersuchungen, die Gegenstand der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit sind.

Im Unterschied zu arteriellen Hirninfarkten kommt es, wie Arbeiten unserer vaskulären Forschungsgruppe zeigen konnten, bei mehr als der Hälfte der Patienten mit venösen Stauungsinfarkten zu einer Rückbildung oder deutlichen Verminderung des Läsionsvolumens (Röttger et al. 2004). Dieser Rückgang geschieht schneller bei Patienten, die eine rasche Rekanalisation der betroffenen Sinus nach MRT-Kriterien aufweisen, hängt aber im Endzustand, ebenso wie der klinische Verlauf der Erkrankung, nicht von Rekanalisation oder Persistenz des Verschlusses ab (Stolz et al. 2004). Arbeiten über Angiogenese, welche den arteriellen Hirninfarkt (am ACM-Okklusionsmodell) zum Gegenstand hatten, konnten die Hochregulation von VEGF-mRNA ab 3 Stunden nach Infarktbeginn mit dem Maximum nach 24h und der Reduktion auf ein niedrigeres Niveau nach 7 Tagen zeigen (Plate et al. 1999). Dies könnte als Hinweis darauf interpretiert werden, dass Angiogenese im Rahmen einer Sinusthrombose einen anderen zeitlichen Verlauf als im Falle eines arteriellen Hirninfarktes nimmt.

Im Rahmen unserer Arbeit konnten wir tierexperimentell eine Angiogenese nach permanentem SSS Verschluss darstellen. In der zweiten Versuchsreihe wurde eine Thrombose des Sinus sagittalis superior (SSS) in 11 Ratten durchgeführt. Die Tötung der Tiere erfolgte nach 6 Stunden (Gruppe I, n=4) und nach 6 Wochen (Gruppe II, n=7), wobei zusätzlich 8 scheinoperierte Ratten als Kontrollgruppe dienten. Nach Kontrastmittelperfusion mit Microfil wurden die Gehirne entnommen und der Mikro-, Nano- und Synchrotron-basierten CT (Voxel-Größe $8 \mu\text{m}^3$, 900 nm^3 , $1,9 \mu\text{m}^3$) zugeführt. Die Querschnittsfläche des SSS, der Mikrogefäße und der kortikalen

Venen wurde gemessen. Die weitere histologische Aufarbeitung der Gewebeschnitte beinhaltete Untersuchungen zur Detektion von VEGF.

Die Thrombose des Sinus sagittalis superior, sechs Stunden nach Induktion, führte in der Gruppe I zu einer Kongestion der Brückenvenen und konsekutiv zu einem signifikanten Anstieg des Brückenvenendurchmessers (Kontrollen $47,7 \pm 1,4 \mu\text{m}$ vs Gruppe I $129,3 \pm 3,9 \mu\text{m}$, $p < 0,001$). Nach sechs Wochen konnten Mikro-, Nano- und Synchrotron-basierte CT ein Netzwerk kleiner neuer Gefäße darstellen, welches sich um den verschlossenen Sinus gruppiert und mit den kortikalen Venen in Verbindung steht. In der Gruppe II war der Durchmesser der Brückenvenen wieder auf dem Niveau der Kontrollgruppe zurückgegangen (Gruppe II $52,1 \pm 1,4 \mu\text{m}$, $p = 0,21$). Die Volumenfraktion und der Querschnitt kortikaler Venen stiegen signifikant an (Gruppe II $0,79 \pm 0,02 \text{ mm}^2$, $p < 0,001$). Dies lässt sich durch eine große Anzahl von kleinsten Gefäßen paraluminal des okkludierten SSS erklären.

Korrespondierend konnte auch histologisch die steigende Zahl der kleinen kortikalen Venen in der Gruppe II beobachtet werden und eine maximale VEGF-Expression in der PKR in der Gruppe II nachgewiesen werden. Die VEGF-Expression zeigte sich über dem SSS und paraluminal maximal. Vermutlich spielt hier eine HIF-1 Alpha vermittelte VEGF-A Expression eine große Rolle.

Interessanterweise blieb eine nennenswerte VEGF-Expression im Bereich der Kortexvenen aus. Dennoch konnte im Mikro- und Nano-CT nach 6 Wochen Sinusokklusion ein signifikanter numerischer Anstieg der Kortexvenen sowie ihrer Volumenfraktion im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt werden. Analog zur Arteriogenese scheinen nach dem Sinusverschluss Scherkräfte, zirkulierende Monozyten und deren Vorläuferzellen in dieser Kondition eine große Rolle zu spielen. Nach dem Verschluss des SSS entwickelt sich somit scheinbar ein enormer Druckgradient innerhalb des Kollateralsystems. Dies führt zum Anstieg der Flussgeschwindigkeit des Blutes, des Druckes, sowie der Schubspannung in den kleinsten Venolen.

Ein herausragendes Ergebnis unserer tierexperimentellen Arbeit stellt somit die Erkenntnis dar, dass im Rahmen einer SHVT nach Thrombosierung eine suffiziente Adaptation durch das bestehende kollaterale venöse System im Sinne einer „Venogenese“ und eine Angiogenese zu greifen scheinen.

Unsere Studie ebnet aufgrund der erzielten Ergebnisse den Weg für weitere Studien, um sichere Aussagen darüber zu treffen, inwieweit tatsächlich der zugrundeliegende Mechanismus im Sinne einer VEGF-/ hypoxievermittelten Angiogenese und/oder eher einer druckvermittelten „Venogenese“ zu interpretieren ist und öffnet zudem Möglichkeiten für weitere Forschungen im Hinblick auf die Angiogenese und deren zeitlichen und räumlichen Verlauf. Basierend auf unseren Ergebnissen gilt es im Rahmen weiterer Untersuchungen die VEGF-induzierte Angiogenese, ihren Verlauf und ihre Lokalisation zu untersuchen. Insbesondere werfen unsere Ergebnisse Fragen nach zeitlichem Unterschied hinsichtlich auf die Lokalisation und Nähe zum Sinus und nach dem Zeitpunkt des Abschlusses der Neoangiogenese auf. Nach tierexperimentellen Untersuchungen zu eben beschriebenen Ansätzen und zu Möglichkeiten einer spezifischen bzw. unspezifischen Angiogenesehemmung mit entsprechendem Erkenntnisgewinn würde sich auch für den klinischen Aspekt eine Grundlage für therapeutische Beeinflussung der Angiogenese bei Patienten mit Sinus- oder Hirnvenenthrombosen bilden. Denkbar wäre eine pharmakologische Intensivierung der Neovaskularisation um die Rekanalisation der verschlossenen venösen Gefäße zu beschleunigen, einen drohenden Anstieg des Hirndruckes zu minimieren und damit einhergehend die Möglichkeit aufkommen zu lassen, die Letalität weiter zu senken.

4.6 Methodische Limitationen der vorliegenden Untersuchung

Unser Thrombosemodell birgt auch Nachteile, weil der permanente Verschluss des SSS nicht den natürlichen Verlauf, den physiologischen/ pathophysiologischen Mechanismus mit Thrombosierung auf der einen und der gleichzeitigen endogenen Fibrinolyse, Angiogenese auf der anderen Seite widerspiegelt. Zudem entwickelte keines der Tiere einen venösen Infarkt. Nakase et al. berichten von einem 50%-igen Anteil an venösen kortikalen Infarkten bei Übergreifen auf Brückenvenen (Nakase, Heimann & Kempfski 1996). Das Modell konnte eine wahrscheinliche Angiogenese nachbilden, Aussagen über den zeitlichen Ablauf dieser können jedoch nicht erzielt werden.

5. Summary

Cerebral vein and sinus thrombosis (CVST) is generally regarded rare. It is a disease which predominantly affects children and young adults. The median age of adult cases is 35-40 years. In adulthood, more than two thirds of cases are females. However, with non-invasive imaging techniques such as magnetic resonance imaging (MRI) or computed tomography (CT) angiography it has become clear that CSVT is by far more frequent than previously thought. Although the true incidence in the general population is not known, the frequency of CSVT in patients with subacute headache of increasing intensity with or without signs of raised intracranial pressure, or headaches in combination with focal neurological deficits, seizures or disturbed consciousness is about 10%. Approximately 50% of patients develop venous brain infarcts which frequently are hemorrhagic. Recanalization has been frequently observed in the early phase of CSVT, but it seems to have no influence on the functional clinical outcome, neither does persistent occlusion. Venous infarcts differ in their behaviour from arterial stroke. Even large MRI-detectable lesions completely resolve over time in more than 50% of patients. Although infarcts resolve faster in patients with early recanalization, the final infarct volume is not influenced by recanalization or persistent occlusion. This may be caused either by adaptation of venous collaterals to the higher flow demand, or by angiogenesis, or by both. An other indication that CSVT might induce angiogenesis is the development of dural arterio-venous fistulas (DAVF) as a complication of the disease. Still it is unclear to what extent CSVT induces angiogenesis, how the venous angioarchitecture is affected, and whether angiogenesis is effective by relieving venous congestion in the upstream cortical veins proximal to the occlusion.

This study examines angiogenesis in a standardized, non-lethal rat model of persistent superior sagittal sinus (SSS) thrombosis. This model allows for standardization of the time of onset and control of physiological variables not possible in human case series. We used micro- and nano-CT to study the venous vascular changes and demonstrate Neoangiogenesis as the main reason for the good clinical outcome and the reduced final infarct volume. These techniques have the advantage that three-dimensional quantification of structural properties of microvascular networks is possible.

In this study we were able to demonstrate neoangiogenesis 6 weeks after thrombus induction within the lumen of the thrombosed SSS as a network of small venules which connect to cortical veins. These newly formed vessels coincide with the locally strong VEGF expression in the organized thrombus consistent with neoangiogenesis. This process is so effective, that the cross-sectional area of contrast filling within the original lumen of the SSS is significantly larger than in control animals. The most important finding is an increase of the cortical venous volume fraction above control levels after 6 weeks, although only traces of VEGF expression could be found in the parasagittal region. The imaging techniques applied in this study are recently developed imaging tools which allow image resolution in the micrometer and submicron-resolution range.

In conclusion we were able to show in this model of non-lethal permanent superior sagittal sinus thrombosis the organization of the thrombus by angiogenesis. Beyond that we observed “venogenesis” in form of an increased cortical venous volume fraction and large transcortical veins remote from the thrombus itself.

6. Literaturverzeichnis

1. Achenbach S. Clinical Use of Multi-Slice CT Coronary Angiography. *Herz*. 2003 Mar;28(2):119-25.
2. Beckmann N. High resolution magnetic resonance angiography non-invasively reveals mouse strain differences in the cerebrovascular anatomy in vivo. *Magn Reson Med*. 2000 Aug; 44:252–258
3. Bentley MD, Ortiz MC, Ritman EL, Romero JC. The use of microcomputed tomography to study microvasculature in small rodents. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 May;282(5):R1267-79.
4. Bernstein MA, Huston J, Lin C, Gibbs GF, Felmlee JP. High-resolution intracranial and cervical MRA at 3.0T: technical considerations and initial experience. *Magn Reson Med*. 2001 Nov;46:955–962
5. Biousse V, Ameri A, Bousser MG. Isolated intracranial hypertension as the only sign of cerebral venous thrombosis. *Neurology*. 1999 Oct 22;53(7):1537-42.
6. Bousser MG, Chiras J, Bories J, Castaigne P. Cerebral venous thrombosis--a review of 38 cases. *Stroke*. 1985 Mar-Apr;16(2):199-213.
7. Bousser MG, Ferro JM. Cerebral venous thrombosis: an update. *Lancet Neurol*. 2007 Feb;6(2):162-70. Review.
8. Bousser MG, Russell R. Cerebral Venous Thrombosis. *Major Problems in Neurology*. Vol. 33. 1997, W.B. Saunders, London, Philadelphia, Tokyo, S. 1-175
9. Bousser MG. Cerebral venous thrombosis. Nothing, heparin, or local thrombolysis? *Stroke*. 1999 Mar; 30: 481–483.
10. Bousser MG. Cerebral venous thrombosis: diagnosis and management. *J Neurol*. 2000 Apr;247:252–258.
11. Bousser MG. Cerebral venous thrombosis: diagnosis and management. *J Neurol*. 2000 Apr;247(4):252-8. Review.
12. Breteau G, Mounier-Vehier F, Godefroy O, Gauvrit JY, Mackowiak-Cordoliani MA, Girot M, Bertheloot D, Hénon H, Lucas C, Leclerc X, Fourrier F, Pruvo JP, Leys D. Cerebral venous thrombosis 3-year clinical outcome in 55 consecutive patients . *J Neurol*. 2003 Jan;250(1):29-35.

13. Buccino G, Scoditti U, Patteri I, Bertolino C, Mancina D. Neurological and cognitive long-term outcome in patients with cerebral venous sinus thrombosis. *Acta Neurol Scand*. 2003 May;107(5):330-5.
14. Buecker A, Spuentrup E, Ruebben A, Günther RW. Artifact-free in-stent lumen visualization by standard magnetic resonance angiography using a new metallic magnetic resonance imaging stent. *Circulation*. 2002 Apr 16;105(15):1772-5.
15. Cakmak S, Derex L, Berruyer M, Nighoghossian N, Philippeau F, Adeleine P, Hermier M, Froment JC, Trouillas P. Cerebral venous thrombosis: clinical outcome and systematic screening of prothrombotic factors. *Neurology*. 2003 Apr 8;60(7):1175-8.
16. Canhão P, Falcão F, Ferro JM. Thrombolytics for cerebral sinus thrombosis. A systematic review. *Cerebrovasc Dis*. 2003; 15: 159–166.
17. Canhão P, Ferro JM, Lindgren AG, Bousser MG, Stam J, Barinagarrementeria F; ISCVT Investigators. Causes and predictors of death in cerebral venous thrombosis. *Stroke*. 2005 Aug;36(8):1720-5. Epub 2005 Jul 7.
18. Cantu C, Alonso E, Jara A, Martínez L, Ríos C, Fernández Mde L, Garcia I, Barinagarrementeria F. Hyperhomocysteinemia, low folate and vitamin B12 concentrations, and methylene tetrahydrofolate reductase mutation in cerebral venous thrombosis. *Stroke*. 2004 Aug;35(8):1790-4.
19. Cantu C, Barinagarrementeria F. Cerebral venous thrombosis associated with pregnancy and puerperium. Review of 67 cases. *Stroke*. 1993 Dec; 24: 1880–1884.
20. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):389-95. Review.
21. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):653-60. Review.
22. Cervós-Navarro J, Kannuki S, Matsumoto K. Neuropathological changes following occlusion of the superior sagittal sinus and cerebral veins in the cat. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1994 Apr;20(2):122-9.
23. Cervós-Navarro J, Kannuki S. Neuropathological findings in the thromboses of cerebral veins and sinuses: vascular aspects. In: Einhüpl K, Kempfski O, Baethman A (eds.). *Cerebral venous thrombosis, Experimental and clinical aspects*. Plenum Press, New York, 1990; pp. 15 – 25

24. Costa MA, Kozuma K, Gaster AL, van Der Giessen WJ, Sabaté M, Foley DP, Kay IP, Ligthart JM, Thaysen P, van Den Brand MJ, de Feyter PJ, Serruys PW. Three dimensional intravascular ultrasonic assessment of the local mechanism of restenosis after balloon angioplasty. *Heart*. 2001 Jan;85(1):73-9.
25. Coutinho JM, Ferro JM, Canhão P, Barinagarrementeria F, Bousser MG, Stam J; ISCVT Investigators. Unfractionated or low-molecular weight heparin for the treatment of cerebral venous thrombosis. *Stroke*. 2010 Nov;41(11):2575-80.
26. Coutinho JM, Majoie CB, Coert BA, Stam J. Decompressive hemicraniectomy in cerebral sinus thrombosis: consecutive case series and review of the literature. *Stroke*. 2009 Jun;40:2233–2235.
27. Crassard I, Bousser MG. Headache in patients with cerebral venous thrombosis [in French]. *Rev Neurol (Paris)*. 2005 Jul;161:706–708.
28. Crassard I, Soria C, Tzourio C, Woimant F, Drouet L, Ducros A, Bousser MG. A negative D-dimer assay does not rule out cerebral venous thrombosis: a series of seventy-three patients. *Stroke*. 2005 Aug;36:1716–1719.
29. Cumurciuc R, Crassard I, Sarov M, Valade D, Bousser MG. Headache as the only neurological sign of cerebral venous thrombosis: a series of 17 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005 Aug;76:1084–1087.
30. de Bruijn SF, Budde M, Teunisse S, de Haan RJ, Stam J. Long-term outcome of cognition and functional health after cerebral venous sinus thrombosis. *Neurology*. 2000 Apr 25;54(8):1687-9.
31. De Bruijn SF, Stam J, Kappelle LJ. Thunderclap headache as first symptom of cerebral venous sinus thrombosis. CVST Study Group. *Lancet*. 1996 Dec 14;348(9042):1623-5.
32. de Bruijn SF, Stam J, Koopman MM, Vandenbroucke JP. Case-control study of risk of cerebral sinus thrombosis in oral contraceptive users and in [correction of who are] carriers of hereditary prothrombotic conditions. The Cerebral Venous Sinus Thrombosis Study Group. *BMJ*. 1998 Feb;316:589–592.
33. De Bruijn SFTM, De Haan RJ, Stam J. Clinical features and prognostic factors of cerebral venous and sinus thrombosis in a prospective series of 59 patients. For the Cerebral Venous Sinus Thrombosis Study Group. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001 Jan; 70: 105–108.

34. De Bruijn SFTM, Stam J. Randomized, placebo-controlled trial of anticoagulant treatment with low-molecular-weight heparin for cerebral sinus thrombosis. For the Cerebral Venous Sinus Thrombosis Study Group. *Stroke*. 1999 Mar; 30: 484–488.
35. De Freitas GR, Bogousslavsky J. Risk factors of cerebral vein and sinus thrombosis. *Front Neurol Neurosci*. 2008;23:23-54. Review.
36. Deindl E, Buschmann I, Hofer IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res*. 2001 Oct 26;89(9):779-86.
37. Dentali F, Crowther M, Ageno W. Thrombophilic abnormalities, oral contraceptives, and risk of cerebral vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2766-73. Epub 2006 Jan 5.
38. Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc*. 1957 Mar; 46(3):208-9.
39. Einhäupl K, Stam J, Boussier MG, De Bruijn SF, Ferro JM, Martinelli I, Masuhr F; European Federation of Neurological Societies. EFNS guideline on the treatment of cerebral venous and sinus thrombosis in adult patients. *Eur J Neurol*. 2010 Oct;17(10):1229-35. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03011.x.
40. Einhäupl KM, Villringer A, Meister W, Mehraein S, Garner C, Pellkofer M, Haberl RL, Pfister HW, Schmiedek P. Heparin treatment in sinus venous thrombosis. *Lancet*. 1991 Oct 12;338(8772):958.
41. Farb RI, Scott JN, Willinsky RA, Montanera WJ, Wright GA, terBrugge KG. Intracranial venous system: gadolinium-enhanced three-dimensional MR venography with auto-triggered elliptic centric-ordered sequence--initial experience. *Radiology*. 2003 Jan;226(1):203-9.
42. Fellner FA, Fellner C, Aichner FT, Mölzer G. Importance of T2*-weighted gradient-echo MRI for diagnosis of cortical vein thrombosis. *Eur J Radiol*. 2005 Nov;56(2):235-9. Epub 2005 Jun 20.
43. Ferro JM, Canhão P, Boussier MG, Stam J, Barinagarrementeria F. ISCVT Investigators. Cerebral vein and dural sinus thrombosis in elderly patients. *Stroke*. 2005 Sep;36:1927–1932.

44. Ferro JM, Canhão P, Bousser MG, Stam J, Barinagarrementeria F; ISCVT Investigators. Early seizures in cerebral vein and dural sinus thrombosis: risk factors and role of antiepileptics. *Stroke*. 2008 Apr;39:1152–1158.
45. Ferro JM, Canhão P, Stam J, Bousser MG, Barinagarrementeria F, for the ISCVT Investigators. Prognosis of cerebral vein and dural sinus thrombosis. Results of the International Study on Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis (ISCVT). *Stroke*. 2004 Mar;35: 664–670.
46. Ferro JM, Lopes MG, Rosas MJ, Ferro MA, Fontes J. Long-term prognosis of cerebral vein and dural sinus thrombosis: results of the VENOPORT Study, *Cerebrovasc Dis* 13 (2002), pp. 272–278.
47. Ferro JM, Crassard I, Coutinho JM, Canhão P, Barinagarrementeria F, Cucchiara B, Derex L, Lichy C, Masjuan J, Massaro A, Matamala G, Poli S, Saadatnia M, Stolz E, Viana-Baptista M, Stam J, Bousser MG; Second International Study on Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis (ISCVT 2) Investigators. Decompressive surgery in cerebrovenous thrombosis: a multicenter registry and a systematic review of individual patient data. *Stroke*. 2011 Oct;42(10):2825-31. Epub 2011 Jul 28. Review.
48. Frey JL, Muro GJ, McDougall CG, Dean BL, Jahnke HK. Cerebral venous thrombosis: combined intrathrombus rtPA and intravenous heparin. *Stroke*. 1999 Mar;30(3):489-94.
49. Frerichs KU, Deckert M, Kempfski O, Schürer L, Einhäupl K, Baethmann A. Cerebral sinus and venous thrombosis in rats induces long-term deficits in brain function and morphology--evidence for a cytotoxic genesis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994 Mar;14(2):289-300.
50. Fries G, Wallenfang T, Hennen J, Velthaus M, Heimann A, Schild H, Perneczky A, Kempfski O. Occlusion of the pig superior sagittal sinus, bridging and cortical veins: multistep evolution of sinus-vein thrombosis. *J Neurosurg*. 1992 Jul;77(1):127-33.
51. Fries G, Wallenfang T, Kempfski O, Hennen J, Velthaus M, Perneczky A. Brain oedema and intracranial pressure in superior sagittal sinus balloon occlusion. An experimental study in pigs. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1990;51:231-2.
52. Gadelha T, André C, Jucá AA, Nucci M. Prothrombin 20210A and oral contraceptive use as risk factors for cerebral venous thrombosis. *Cerebrovasc Dis*. 2005;19(1):49-52. Epub 2004 Nov 3.

53. Galloni M, Prunotto M, Santarelli A, Laborde F, Dibie A, Isaia C, Monari E, Gatti AM, Pasquino E. Carbon-coated stents implanted in porcine iliac and renal arteries: histologic and histomorphometric study. *J Vasc Interv Radiol*. 2003 Aug;14(8):1053-61.
54. Girot M, Ferro JM, Canhão P, Stam J, Bousser MG, Barinagarrementeria F, Leys D. ISCVT Investigators. Predictors of outcome in patients with cerebral venous thrombosis and intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2007 Feb;38:337–342.
55. Gosk-Bierska I, Wysokinski W, Brown RD Jr, Karnicki K, Grill D, Wiste H, Wysokinska E, McBane RD 2nd. Cerebral venous sinus thrombosis: Incidence of venous thrombosis recurrence and survival. *Neurology*. 2006 Sep 12;67(5):814-9.
56. Gotoh M, Ohmoto T, Kuyama H. Experimental study of venous circulatory disturbance by dural sinus occlusion. *Acta Neurochir (Wien)*. 1993;124(2-4):120-6.
57. Goyen M, Herborn CU, Kröger K, Lauenstein TC, Debatin JF, Ruehm SG. Detection of atherosclerosis: systemic imaging for systemic disease with whole-body three-dimensional MR angiography--initial experience. *Radiology*. 2003 Apr;227(1):277-82. Epub 2003 Feb 19.
58. Grewe PH, Thomas D, Machraoui A, Barmeyer J, Müller KM. Coronary morphologic findings after stent implantation. *Am J Cardiol*. 2000 Mar 1;85(5):554-8.
59. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 1994 Apr;11(2):187-96.
60. Heil M, Eitenmüller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med*. 2006 Jan-Mar;10(1):45-55.
61. Henke PK. Plasmin and matrix metalloproteinase system in deep venous thrombosis resolution. *Vascular*. 2007 Nov-Dec;15(6):366-71.
62. Herings RM, Urquhart J, Leufkens HG. Venous thromboembolism among new users of different oral contraceptives. *Lancet*. 1999 Jul 10;354(9173):127-8. Erratum in: *Lancet* 1999 Oct 23;354(9188):1478.

63. Herrmann KA, Sporer B, Yousry TA. Thrombosis of the internal cerebral vein associated with transient unilateral thalamic edema: a case report and review of the literature. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2004 Sep;25(8):1351-5. Review.
64. Horowitz M, Purdy P, Unwin H, et al. Treatment of dural sinus thrombosis using selective catheterisation and urokinase. *Ann Neurol*. 1995 Jul;38: 58–67.
65. Humphries J, Gossage JA, Modarai B, Burnand KG, Sisson TH, Murdoch C, Smith A. Monocyte urokinase-type plasminogen activator up-regulation reduces thrombus size in a model of venous thrombosis. *J Vasc Surg*. 2009 Nov;50(5):1127-34. Epub 2009 Aug 22.
66. Idbaih A, Boukobza M, Crassard I, Porcher R, Bousser MG, Chabriat H. MRI of clot in cerebral venous thrombosis: high diagnostic value of susceptibility-weighted images. *Stroke*. 2006 Apr;37:991–995.
67. Ito K, Tsugane R, Ikeda A, Suzuki Y, Sato K. Cerebral hemodynamics and histological changes following acute cerebral venous occlusion in cats. *Tokai J Exp Clin Med*. 1997 Sep;22(3):83-93.
68. Jorgensen SM, Demirkaya O, Ritman EL. Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT. *Am J Physiol*. 1998 Sep;275(3 Pt 2):H1103-14.
69. Kalbag RM. Dural sinus thrombosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1967 Dec;30(6):586.
70. Kaminogo M, Ishimaru H, Morikawa M, Ochi M, Ushijima R, Tani M, Matsuo Y, Kawakubo J, Shibata S. Diagnostic potential of short echo time MR spectroscopy of gliomas with single-voxel and point-resolved spatially localised proton spectroscopy of brain. *Neuroradiology*. 2001 May;43(5):353-63.
71. Kantor B, Jorgensen SM, Lund PE, Chmelik MS, Reyes DA, Ritman EL. Cryostatic micro-computed tomography imaging of arterial wall perfusion. *Scanning*. 2002 Jul-Aug;24(4):186-90.
72. Kearon C, Gent M, Hirsh J, Weitz J, Kovacs MJ, Anderson DR, Turpie AG, Green D, Ginsberg JS, Wells P, MacKinnon B, Julian JA. A comparison of three months of anticoagulation with extended anticoagulation for a first episode of idiopathic venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 1999 Mar 25;340(12):901-7. Erratum in: *N Engl J Med* 1999 Jul 22;341(4):298.

73. Kearon C, Kahn SR, Agnelli G, Goldhaber S, Raskob GE, Comerota AJ. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008 Jun; 133: 454S–545S.
74. Keller E, Pangalu A, Fandino J, Könü D, Yonekawa Y. Decompressive craniectomy in severe cerebral venous and dural sinus thrombosis. *Acta Neurochir Suppl.* 2005;94:177–183.
75. Kim SY, Suh JH. Direct endovascular thrombolytic therapy for dural sinus thrombosis: infusion of alteplase. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1997 Apr; 18: 639–645.
76. Kimura R, Nakase H, Tamaki R, Sakaki T. Vascular endothelial growth factor antagonist reduces brain edema formation and venous infarction. *Stroke.* 2005 Jun;36(6):1259-63. Epub 2005 May 5.
77. Knyihár-Csillik E, Tajti J, Chadaide Z, Csillik B, Vécsei L. Functional immunohistochemistry of neuropeptides and nitric oxide synthase in the nerve fibers of the supratentorial dura mater in an experimental migraine model. *Microsc Res Tech.* 2001 May 1;53(3):193-211.
78. Kosinski CM, Mull M, Schwarz M, Koch B, Biniek R, Schläfer J, Milkereit E, Willmes K, Schiefer J. Do normal D-dimer levels reliably exclude cerebral sinus thrombosis? *Stroke.* 2004 Dec;35(12):2820-5. Epub 2004 Oct 28.
79. Kuehne T, Saeed M, Moore P, Gleason K, Reddy G, Teitel D, Higgins CB. Influence of blood-pool contrast media on MR imaging and flow measurements in the presence of pulmonary arterial stents in swine. *Radiology.* 2002 May;223(2):439-45.
80. Kuehnen J, Schwartz A, Neff W, Hennerici M. Cranial nerve syndrome in thrombosis of the transverse/sigmoid sinuses. *Brain.* 1998 Feb;121 (Pt 2):381-8.
81. Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res.* 1990 Nov 15;60(4):269-80.
82. Lalive PH, de Moerloose P, Lovblad K, Sarasin FP, Mermillod B, Sztajzel R. Is measurement of D-dimer useful in the diagnosis of cerebral venous thrombosis? *Neurology.* 2003 Oct 28;61(8):1057-60.
83. Langheinrich AC, Bohle RM, Greschus S, Hackstein N, Walker G, Von Gerlach S, Rau WS, Holschermann H. Atherosclerotic lesions at micro CT:

- feasibility for analysis of coronary artery wall in autopsy specimens. *Radiology*. 2004 Jun; 231:675–681.
84. Langheinrich AC, Leithäuser B, Greschus S, Von Gerlach S, Breithecker A, Matthias FR, Rau WS, Bohle RM. Acute rat lung injury: feasibility of assessment with micro-CT. *Radiology*. 2004 Oct;233(1):165-71. Epub 2004 Aug 18.
85. Langheinrich AC, Michniewicz A, Bohle RM, Ritman EL. Vasa vasorum neovascularization and lesion distribution among different vascular beds in ApoE^{-/-}/LDL^{-/-} double knockout mice. *Atherosclerosis*. 2007 Mar;191:73–81
86. Langheinrich AC, Michniewicz A, Sedding DG, Walker G, Beighley PE, Rau WS, Bohle RM, Ritman EL. Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E^{-/-}/low-density lipoprotein^{-/-} double knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Feb;26:347–352.
87. Langheinrich AC, Wienhard J, Vormann S, Hau B, Bohle RM, Zygmunt M. Analysis of the fetal placental vascular tree by X-ray micro-computed tomography. *Placenta*. 2004 Jan;25(1):95-100.
88. Langheinrich AC, Yeniguen M, Ostendorf A, Marhoffer S, Dierkes C, von Gerlach S, Nedelmann M, Kampschulte M, Bachmann G, Stolz E, Gerriets T. In vitro evaluation of the sinus sagittalis superior thrombosis model in the rat using 3D micro- and nanocomputed tomography. *Neuroradiology*. 2010 Sep;52(9):815-21. Epub 2009 Nov 18.
89. Lanska DJ, Kryscio RJ. Risk factors for peripartum and postpartum stroke and intracranial venous thrombosis. *Stroke*. 2000 Jun;31(6):1274-82.
90. Lanterna LA, Gritti P, Manara O, Grimod G, Bortolotti G, Biroli F. Decompressive surgery in malignant dural sinus thrombosis: report of 3 cases and review of the literature. *Neurosurg Focus*. 2009 Jun;26:E5.
91. Leach JL, Fortuna RB, Jones BV, Gaskill-Shiple MF. Imaging of cerebral venous thrombosis: current techniques, spectrum of findings, and diagnostic pitfalls. *Radiographics*. 2006 Oct;26(suppl 1):S19–S41.
92. Leach JL, Wolujewicz M, Strub WM. Partially recanalized chronic dural sinus thrombosis: findings on MR imaging, time-of-flight MR venography, and contrast-enhanced MR venography. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007 Apr;28(4):782-9.

93. Lee SK, Kim BS, Terbrugge KG. Clinical Presentation, Imaging and Treatment of Cerebral Venous Thrombosis (CVT). *Interv Neuroradiol.* 2002 Mar 30;8(1):5-14. Epub 2004 Oct 20.
94. Lerman A, Ritman EL. Evaluation of microvascular anatomy by micro-CT. *Herz.* 1999 Nov;24(7):531-3. Review.
95. Lettau M, Laible M, Barrows RJ, Heiland S, Bendszus M, Hähnel S. 3-T contrast-enhanced MR angiography with parallel imaging in cerebral venous and sinus thrombosis. *J Neuroradiol.* 2011 Feb 24.
96. Lettau M, Sartor K, Heiland S, Hähnel S. 3T high-spatial-resolution contrast-enhanced MR angiography of the intracranial venous system with parallel imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009 Jan;30:185–187
97. Lijfering WM, Christiansen SC, Rosendaal FR, Cannegieter SC. Contribution of high factor VIII, IX and XI to the risk of recurrent venous thrombosis in factor V Leiden carriers. *J Thromb Haemost.* 2009 Nov;7(11):1944-6. Epub 2009 Aug 19.
98. Linn J, Ertl-Wagner B, Seelos KC, Strupp M, Reiser M, Brückmann H, Brüning R. Diagnostic value of multidetector-row CT angiography in the evaluation of thrombosis of the cerebral venous sinuses. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2007 May;28:946–952.
99. Macchi PJ, Grossman RI, Gomori JM, Goldberg HI, Zimmerman RA, Bilaniuk LT. High field MR imaging of cerebral venous thrombosis. *J Comput Assist Tomogr.* 1986 Jan-Feb;10(1):10-5.
100. Maehara N. Experimental microcomputed tomography study of the 3D microangioarchitecture of tumors. *Eur Radiol.* 2003 Jul;13(7):1559-65. Epub 2002 Nov 7.
101. Martinelli I, Battaglioli T, Pedotti P, Cattaneo M, Mannucci PM. Hyperhomocysteinemia in cerebral vein thrombosis. *Blood.* 2003 Aug;102:1363–1366.
102. Martinelli I, Landi G, Merati G, Cella R, Toso A, Mannucci PM. Factor V gene mutation is a risk factor for cerebral venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1996;75:393–394.
103. Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med.* 1998;338:1793–1797.

104. Masuhr F, Busch M, Amberger N, Ortwein H, Weih M, Neumann K, Einhäupl K, Mehraein S. Risk and predictors of early epileptic seizures in acute cerebral venous and sinus thrombosis. *Eur J Neurol.* 2006;13:852–856.
105. Masuhr F, Einhäupl K. Treatment of cerebral venous and sinus thrombosis. *Front Neurol Neurosci.* 2008;23:132–143.
106. Masuhr F, Mehraein S, Einhäupl K. Cerebral venous and sinus thrombosis. *J Neurol.* 2004 Jan;251(1):11-23. Review.
107. Meyer JM, Buecker A, Schuermann K, Ruebben A, Guenther RW. MR evaluation of stent patency: in vitro test of 22 metallic stents and the possibility of determining their patency by MR angiography. *Invest Radiol.* 2000 Dec;35(12):739-46.
108. Moritz R, Eaker DR, Langheinrich AC, Jorgensen SM, Bohle RM, Ritman EL. Quantification of vasa vasorum density in multi-slice computed tomographic coronary angiograms: role of computed tomographic image voxel size. *J Comput Assist Tomogr.* 2010 Mar-Apr;34(2):273-8.
109. Nakase H, Heimann A, Kempfski O. Local cerebral blood flow in a rat cortical vein occlusion model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 Jul;16(4):720-8.
110. 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 Jan 26;1130(1):188-96.
111. Nissen SE, Yock P. Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications. *Circulation.* 2001 Jan 30;103(4):604-16. Review.
112. Plate KH, Beck H, Danner S, Allegrini PR, Wiessner C. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999 Jun;58(6):654-66.
113. Preter M, Tzourio C, Ameri A, Bousser MG. Long-term prognosis in cerebral venous thrombosis. Follow-up of 77 patients. *Stroke.* 1996 Feb;27(2):243-6.
114. Renowden S. Cerebral venous sinus thrombosis. *Eur Radiol.* 2004 Feb;14(2):215-26. Epub 2003 Oct 3. Review.

115. Ritman EL, Jorgensen SM, Lund PE. Synchrotron-based micro-ct of in situ biological basic functional units and their integration. *Proc SPIE, Developments in X-Ray Tomography*. 1997;3149:13-24.
116. Ritman EL, Bolander ME, Fitzpatrick LA, Turner RT. Micro-CT imaging of structure-to-function relationship of bone microstructure and associated vascular involvement. *Technol Health Care*. 1998 Dec;6(5-6):403-12.
117. Rodallec MH, Krainik A, Feydy A, Hélias A, Colombani JM, Jullès MC, Marteau V, Zins M. Cerebral venous thrombosis and multidetector CT angiography: tips and tricks. *Radiographics*. 2006 Oct;26 Suppl 1:S5-18; discussion S42-3. Review.
118. Rodriguez-Porcel M, Lerman A, Ritman EL, Wilson SH, Best PJ, Lerman LO. Altered myocardial microvascular 3D architecture in experimental hypercholesterolemia. *Circulation*. 2000 Oct 24;102(17):2028-30.
119. Rothbart D, Awad IA, Lee J, Kim J, Harbaugh R, Criscuolo GR. Expression of angiogenic factors and structural proteins in central nervous system vascular malformations. *Neurosurgery*. 1996 May;38(5):915-24; discussion 924-5.
120. Röther J, Waggie K, van Bruggen N, de Crespigny AJ, Moseley ME. Experimental cerebral venous thrombosis: evaluation using magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996 Nov;16(6):1353-61.
121. Röttger C, Bachmann G, Gerriets T, Kaps M, Kuchelmeister K, Schachenmayr W, Walberer M, Wessels T, Stolz E. A new model of reversible sinus sagittalis superior thrombosis in the rat: magnetic resonance imaging changes. *Neurosurgery*. 2005 Sep;57(3):573-80; discussion 573-80.
122. Röttger C, Madlener K, Heil M, Gerriets T, Walberer M, Wessels T, Bachmann G, Kaps M, Stolz E. Is heparin treatment the optimal management for cerebral venous thrombosis? Effect of abciximab, recombinant tissue plasminogen activator, and enoxaparin in experimentally induced superior sagittal sinus thrombosis. *Stroke*. 2005 Apr;36(4):841-6. Epub 2005 Feb 24.
123. Röttger C, Trittmacher S, Gerriets T, Blaes F, Kaps M, Stolz E. Reversible MR imaging abnormalities following cerebral venous thrombosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005 Mar;26(3):607-13.

124. Schaller B, Graf R, Wienhard K, Heiss WD. A new animal model of cerebral venous infarction: ligation of the posterior part of the superior sagittal sinus in the cat. *Swiss Med Wkly*. 2003 Jul 26;133(29-30):412-8.
125. Schwarz S, Daffertshofer M, Schwarz T, Georgiadis D, Baumgartner RW, Hennerici M, Groden C. Current controversies in the diagnosis and management of cerebral venous and dural sinus thrombosis]. *Nervenarzt*. 2003 Aug;74(8):639-53. Review. German.
126. Selim M, Fink J, Linfante I, Kumar S, Schlaug G, Caplan LR. Diagnosis of cerebral venous thrombosis with echo-planar T2*-weighted magnetic resonance imaging. *Arch Neurol*. 2002;59:1021–1026.
127. Shinohara Y, Yoshitoshi M, Yoshii F. Appearance and disappearance of empty delta sign in superior sagittal sinus thrombosis. *Stroke*. 1986 Nov-Dec;17(6):1282-4.
128. Simopoulos DN, Gibbons SJ, Malysz J, Szurszewski JH, Farrugia G, Ritman EL, Moreland RB, Nehra A. Corporeal structural and vascular micro architecture with X-ray micro computerized tomography in normal and diabetic rabbits: histopathological correlation. *J Urol*. 2001 May;165(5):1776-82.
129. Shin Y, Nakase H, Nakamura M, Shimada K, Konishi N, Sakaki T. Expression of angiogenic growth factor in the rat DAVF model. *Neurol Res*. 2007 Oct;29(7):727-33.
130. Spuentrup E, Ruebben A, Stuber M, Günther RW, Buecker A. Metallic renal artery MR imaging stent: artifact-free lumen visualization with projection and standard renal MR angiography. *Radiology*. 2003 Jun;227(3):897-902.
131. Stam J, Majoie CB, van Delden OM, van Lienden KP, Reekers JA. Endovascular thrombectomy and thrombolysis for severe cerebral sinus thrombosis: a prospective study. *Stroke*. 2008 May;39(5):1487-90. Epub 2008 Mar 13.
132. Stam J. Cerebral venous and sinus thrombosis: incidence and causes. *Adv Neurol*. 2003;92:225-32. Review.
133. Stam J. Thrombosis of the cerebral veins and sinuses. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1791-8. Review.
134. Stefini R, Latronico N, Cornali C, Rasulo F, Bollati A. Emergent decompressive craniectomy in patients with fixed dilated pupils due to cerebral

- venous and dural sinus thrombosis: report of three cases. *Neurosurgery*. 1999 Sep;45(3):626-9; discussion 629-30.
135. Stolz E, Kemkes-Matthes B, Pötzsch B, Hahn M, Kraus J, Wirbartz A, Kaps M. Screening for thrombophilic risk factors among 25 German patients with cerebral venous thrombosis. *Acta Neurol Scand*. 2000 Jul;102(1):31-6.
136. Stolz E, Rahimi A, Gerriets T, Kraus J, Kaps M. Cerebral venous thrombosis: an all or nothing disease? Prognostic factors and long-term outcome. *Clin Neurol Neurosurg*. 2005 Feb;107(2):99-107.
137. Stolz E, Trittmacher S, Rahimi A, Gerriets T, Röttger C, Siekmann R, Kaps M. Stroke. Influence of recanalization on outcome in dural sinus thrombosis: a prospective study. 2004 Feb;35(2):544-7.
138. Stracke CP, Katoh M, Wiethoff AJ, Parsons EC, Spangenberg P, Spuntrup E. Molecular MRI of cerebral venous sinus thrombosis using a new fibrin-specific MR contrast agent. 2007, *Stroke* 38:1476–1481.
139. Stracke CP, Spuntrup E, Katoh M, Günther RW, Spangenberg P. New experimental model of sinus and cortical vein thrombosis in pigs for MR imaging studies. *Neuroradiology*. 2006 Oct;48(10):721-9.
140. Tanislav C, Siekmann R, Sieweke N, Allendörfer J, Pabst W, Kaps M, Stolz E. Cerebral vein thrombosis: clinical manifestation and diagnosis. *BMC Neurol*. 2011 Jun 10;11:69.
141. Terada T, Tsuura M, Komai N, Higashida RT, Halbach VV, Dowd CF, Wilson CB, Hieshima GB. The role of angiogenic factor bFGF in the development of dural AVFs. *Acta Neurochir (Wien)*. 1996;138(7):877-83.
142. Ungersböck K, Heimann A, Kempfski O. Cerebral blood flow alterations in a rat model of cerebral sinus thrombosis. *Stroke*. 1993 Apr;24(4):563-9;
143. Urban PP, Müller-Forell W. Clinical and neuroradiological spectrum of isolated cortical vein thrombosis. *J Neurol*. 2005 Dec;252(12):1476-81. Epub 2005 Jul 18.
144. Ventura P, Cobelli M, Marietta M, Panini R, Rosa MC, Salvioli G. Hyperhomocysteinemia and other newly recognized inherited coagulation disorders (factor V Leiden and prothrombin gene mutation) in patients with idiopathic cerebral vein thrombosis. *Cerebrovasc Dis*. 2004;17:153–159.

145. Virapongse C, Cazenave C, Quisling R, Sarwar M, Hunter S. The empty delta sign: frequency and significance in 76 cases of dural sinus thrombosis. *Radiology*. 1987 Mar;162(3):779-85.
146. von Birgelen C, Mintz GS, Nicosia A, Foley DP, van der Giessen WJ, Bruining N, Arijian SG, Roelandt JR, de Feyter PJ, Serruys PW. Electrocardiogram-gated intravascular ultrasound image acquisition after coronary stent deployment facilitates on-line three-dimensional reconstruction and automated lumen quantification. *J Am Coll Cardiol*. 1997 Aug;30(2):436-43.
147. Wan SY, Kiraly AP, Ritman EL, Higgins WE. Extraction of the hepatic vasculature in rats using 3-D micro-CT images. *IEEE Trans Med Imaging*. 2000 Sep;19(9):964-71.
148. Wang G. X-ray micro-CT with a displaced detector array. *Med Phys*. 2002 Jul;29(7):1634-6.
149. Wang J, Tan HQ, Li MH, Sun XJ, Fu CM, Zhu YQ, Zhou B, Xu HW, Wang W, Xue B. Development of a new model of transvenous thrombosis in the pig superior sagittal sinus using thrombin injection and balloon occlusion. *J Neuroradiol*. 2010 May;37(2):109-15.
150. Wasay M, Bakshi R, Kojan S, Bobustuc G, Dubey N, Unwin DH. Nonrandomized comparison of local urokinase thrombolysis versus systemic heparin anticoagulation for superior sagittal sinus thrombosis. *Stroke*. 2001 Oct; 32: 2310–2317.
151. Weih M, Mehraein S, Valdueza JM, Einhäupl KM, Vetter B, Kulozik AE. Coincidence of factor V Leiden mutation and a mutation in the prothrombin gene at position 20210 in a patient with puerperal cerebral venous thrombosis. *Stroke*. 1998 Aug;29(8):1739-40.
152. Wetzel SG, Kirsch E, Stock KW, Kolbe M, Kaim A, Radue EW. Cerebral veins: comparative study of CT venography with intraarterial digital subtraction angiography. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1999 Feb;20:249–255.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Kaps danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Neurologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität durchführen zu können.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Erwin P. Stolz möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung dieses Themas, sowie für die stets menschlich und fachlich hochwertige Betreuung dieser Arbeit bedanken. Durch die Einblicke, die er mir jenseits dieser Dissertation auch klinisch ermöglichte, bedanke ich mich recht herzlich.

Kein geringerer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Tibo Gerriets, der mich durch die überraschende und zugleich freundliche Aufnahme in die vaskuläre Arbeitsgruppe für das wissenschaftliche Arbeiten entscheidend motiviert hat und über diese Arbeit hinaus mir als Mentor stetige tatkräftige Unterstützung gewährt hat.

Den Tierärztinnen Frau Dr. med. vet. Nouha Ritschel, Simone Dönges und Nadine Schleicher danke ich für die stets freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projektes und der Projekte darüberhinaus. Sie zeigten stets großen Einsatz und Geschick im Umgang mit den Tieren und waren geduldige Supervisoren bei der praktischen Durchführung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. Alexander Langheinrich und Frau Martels von der diagnostischen Radiologie der Uniklinik Gießen danke ich für die Unterweisung und für die interessanten Einblicke in die Welt der Mikro- und Nano-Computertomographie.

Meinem Kollegen Martin Jünemann danke ich sehr für seine freundschaftliche Unterstützung und fortwährende Ermutigung während der Verfassung der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinen Geschwistern und meiner Rasha für ihren Rückhalt, die Motivation, die Aufmunterungen und die uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen.

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

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

9. Anlage

Die wesentlichen Teile dieser Arbeit sind in folgenden zwei wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert worden:

9.1 Publikationen

In vitro evaluation of the sinus sagittalis superior thrombosis model in the rat using 3D micro- and nanocomputed tomography.

Langheinrich AC*, Yeniguen M*, Ostendorf A, Marhoffer S, Dierkes C, von Gerlach S, Nedelmann M, Kampschulte M, Bachmann G, Stolz E, Gerriets T.

Neuroradiology. 2010 Sep;52(9):815-21. Epub 2009 Nov 18.

Impact Factor: 2,87

*both authors contributed equally.

Abstract:

INTRODUCTION: Thrombosis of the cerebral veins and sinus are common causes of stroke. Animal models help us to understand the underlying pathophysiology of this condition. Therefore, the purpose of our study was to evaluate a well-established model for sinus sagittalis (SSS) thrombosis using micro- and nanocomputed tomography (CT) imaging. **METHODS:** SSS thrombosis was performed in four rats. After contrast perfusion, brains were isolated and scanned using micro-CT at (8 microm)(3) voxel size to generate 3D images of the cerebral vasculature. For more detailed information on vascular perfusion territories, nano-CT imaging was performed to investigate the boundary layer of contrast-enhanced vessels and the occluded veins. The venous and arterial vascular volume fraction and gray scale measurements were obtained in the SSS thrombosis group and compared to controls. The significance of differences in vascular volume fraction and gray scale measurements was tested with analysis of variance. Results were complemented with histology. **RESULTS:** Micro-CT proved to accurately visualize and differentiate vascular occlusion territories performed in the SSS thrombosis model. Moreover, 3D micro-CT provided quantitative information on arterial and venous vascular volume fraction. Micro-CT imaging enables a total 3D visualization of complications (ventricle rupture) in the SSS thrombosis model. We established gray scale measurements by

which focal cerebral ischemia could be radiographically categorized ($p < 0.001$).
CONCLUSIONS: Using nano-CT, the interface of contrast-perfused and occluded veins can be visualized. Micro-CT is feasible for analysis and differentiation of perfusion territories in an animal model of focal cerebral ischemia.

Angioarchitectural changes in subacute cerebral venous thrombosis. A synchrotron-based micro- and nano-CT study.

Stolz E*, Yeniguen M*, Kreisel M, Kampschulte M, Doenges S, Sedding D, Ritman EL, Gerriets T, Langheinrich AC.

Neuroimage. 2011 Feb 1;54(3):1881-6. Epub 2010 Oct 23.

Impact Factor: 5,932

*both authors contributed equally.

Abstract

It is well known that recanalization of thrombosed cerebral sinuses occurs early but without marked influence on the long-term outcome and on final venous infarct volume on magnetic resonance imaging. To better understand the possible microvascular mechanisms behind these clinical observations, we evaluated the sequels of subacute superior sagittal sinus (SSS) thrombosis in rats using micro- and nano-CT imaging of the same specimen to provide large volume and high resolution CT image data respectively. SSS thrombosis was induced in 11 animals which were euthanized after 6h (n=4) or 6 weeks (n=7). Eight sham-operated rats served as controls. After infusion of contrast into the vasculature of the brains, these were isolated and scanned using micro-, nano-, and synchrotron-based micro-CT ((8 μm^3), (900 nm)³, and (1.9 μm^3) voxel sizes). The cross-sectional area of the superior sagittal sinus, microvessels and cortical veins were quantified. Tissue sections were stained against VEGF antigen. Immunohistochemistry was confirmed using quantitative rtPCR. SSS thrombosis led to a congestion of the bridging veins after 6h. After 6 weeks, a network of small vessels surrounding the occluded SSS was present with concurrent return towards the diameter of the draining bridging veins of controls. This microvascular network connected to cortical veins as demonstrated by nano- and synchrotron-based micro-CT. Also the volume fraction and number of cortical veins increased significantly. Immunohistochemistry in the region of the

microvascular network demonstrated a strong immunoreactivity against VEGF, confirmed by rtPCR. The sequel of subacute SSS thrombosis induced a network of microvessels ("venogenesis") draining the bridging veins. Also the volume fraction of cortical veins increased significantly.

Weitere Publikationen

Combined contrast-enhanced ultrasound and rt-PA treatment is safe and improves impaired microcirculation after reperfusion of middle cerebral artery occlusion.

Nedelmann M, Ritschel N, Doenges S, Langheinrich AC, Acker T, Reuter P, Yeniguen M, Pukropski J, Kaps M, Mueller C, Bachmann G, Gerriets T.

J Cereb Blood Flow Metab. 2010 Oct;30(10):1712-20. Epub 2010 Jun 9.

Impact Factor: 4,522

Evaluation of the middle cerebral artery occlusion techniques in the rat by in-vitro 3-dimensional micro- and nano computed tomography.

Langheinrich AC*, Yeniguen M*, Ostendorf A, Marhoffer S, Kampschulte M, Bachmann G, Stolz E, Gerriets T.

BMC Neurol. 2010 May 28;10:36.

Impact Factor: 2,80

*contributed equally.

Posterbeiträge

27. Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Neurointensiv- und Notfallmedizin
20.01.2010 - 23.01.2010

Ursache eines Lobärhämatoms: Amyloidblutung oder Sinusthrombose oder beides?

M. Jünemann, M. Yenigün, M. Kaps, E. Stolz (Gießen)

XIX European Stroke Conference (ESC) in Barcelona 25 – 28 May 2010

Quantitative imaging of neovascularisation after experimental superior sagittal sinus thrombosis using synchrotron-based Micro-CT and Nano-CT

M. Yeniguen, E. Stolz, S. Doenges, M. Kreisel, M. Kampschulte, D. Sedding,
E. Ritman, T. Gerriets, A.C. Langheinrich,

Neurowoche 2010

Arbeitsgemeinschaft Klinische Neurowissenschaften

Mannheim 21.09.2010 - 25.09.2010

Lageabhängige Flussrichtung der V. basalis bei Posteriorinfarkt

M. Yenigün, M. Jünemann, M. Kaps, T. Gerriets, E. Stolz (Gießen)

10. Abkürzungsverzeichnis

A. carotis	Arteria carotis
Ae.	Arteriae
CCD-Detektor	Charge-Coupled-Device-Detektor
CCT	Kraniale Computertomographie
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Computertomographie
CTA	CT-Angiographie
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
eV	Elektronenvolt
FGF-2	Fibroblast-Growth-Factor 2
FLAIR	Fluid Attenuated Inversion Recovery
FOV	Field of View
GCS	Glasgow-Coma-Scale
HIF-1	Hypoxia-Inducible-Factor 1
ICP	Intrakranieller Druck
ISCVT	International Study on Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis
KeV	Kilo-Elektronenvolt

kV	Kilovolt
LaB6- Kathode	Lanthaniumborid-Kathode
MB	Megabite
μ A	Mikroampere
μ CT	Mikro-Computertomographie
Mikro-CT	Mikro-Computertomographie
mm	Millimeter
MRA	MR-Angiographie
MRT	Magentresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
Nano-CT	Nano-Computertomographie
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSLS	National Synchrotron Light Source
PCR	Polymerase- Ketten- Reaktion
PDw MRT	Proton density MRI
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
rCBF	Regionale zerebrale Hirndurchblutung
RNA	Ribonukleinsäure
rtPCR	reverse-transkriptase-PCR
s	Sekunde

SAXS	Small Angle X-Ray Scattering Effekt
SHVT	Sinus- und Hirnvenenthrombose
SSS	Sinus Sagittalis Superior
T1w SE	T1 gewichtete Spin-Echo-Sequenz
T2 w SE	T2 gewichtete Spin-Echo-Sequenz
T2*w GRE	T2* gewichtete Gradienten-Echo Sequenz
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
V. jugularis	Vena jugularis
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-mRNA	VEGF-messenger RNA
Vv.	Venae
ZNS	Zentrales Nervensystem

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift