

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München, Klinikum Großhadern
Ehem. Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Brandt
Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

**Einfluß von rt-PA auf die Infarktgröße und den Abbau
der mikrovaskulären Basalmembran nach experimenteller
fokaler zerebraler Ischämie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Katharina Grobholz

aus
München

Jahr
2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G.F. Hamann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Nikolaus Plesnila
Prof. Dr. Roman Haberl
Priv. Doz. Dr. Shahnaz Chr. Azad

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. D. Burggraf

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2008

Diese Arbeit ist selbständig und ohne Zuhilfenahme anderer als der angegebenen Hilfsmittel entstanden. Alle der Literatur entnommenen Erkenntnisse sind als solche kenntlich gemacht und ihrer Herkunft entsprechend einzeln nachgewiesen.

1. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S.7
1.1. Der ischämische Hirninfarkt	S.7
1.1.1. Epidemiologie	S.7
1.1.2. Die Therapie des ischämischen Hirninfarktes	S.7
1.1.3. Die zerebrale Ischämie	S.8
1.1.4. Die Reperfusion	S.9
1.2. Das mikrovaskuläre System	S.10
1.3. Die Fibrinolyse	S.15
1.3.1. Das Plasminogen-Plasmin-System	S.15
1.3.2. Rekombinant Tissue Plasminogen Aktivator (rt-PA)	S.19
1.4. Fragestellung	S.19
2. Material und Methoden	S.21
2.1. Tierexperimentelles Modell	S.21
2.1.1. Versuchsaufbau	S.21
2.1.2. Präparationsprotokoll des Fadenokklusionsmodells	S.22
2.1.3. Administration von rt-PA	S.25
2.1.4. Reperfusion	S.25
2.1.5. Herstellung der Hirnschnitte	S.25
2.2. Immunhistochemie	S.26

2.2.1. Prinzipien der Färbung	S.26
2.2.2. Kollagenfärbung	S.27
2.2.3. MAP-2-Färbung	S.28
2.3. Digitale Auswertung mit Optimas	S.30
2.3.1. Arbeitsschritte	S.30
2.3.2. Berechnung des Infarktvolumen	S.31
2.3.3. Berechnung von Gefäßanzahl und Gefäßdichte	S.32
2.4. Proteinisolierung und Western Blot	S.35
2.4.1. Versuchsprotokoll	S.35
2.4.2. Auswertung	S.38
2.5. Statistik	S.40
3. Ergebnisse	S.41
3.1. Immunhistochemie	S.42
3.1.1. Infarktvolumen	S.42
3.1.2. Der Einfluss von rt-PA auf die Mikrogefäße	S.43
3.2. Western Blot	S.48
4. Diskussion	S. 53
4.1. Hauptergebnisse	S. 53
4.2. Der Einfluss von rt-PA auf die Basalmembran	S. 53
4.3. Der Einfluss von rt-PA auf das Infarktvolumen	S.57
4.4. Schlussfolgerungen	S. 59
4.5. Methodische und konzeptionelle Einschränkungen der Arbeit	S.60

5.	Zusammenfassung	S. 62
6.	Literaturverzeichnis	S. 65
7.	Lebenslauf	S.76
8.	Danksagung	S.78

1. Einleitung

1.1. Der ischämische Hirninfarkt

1.1.1. Epidemiologie

Der Schlaganfall zählt zu den wichtigsten Erkrankungen in unserer Gesellschaft und lag bisher an dritter Stelle der Todesursachenstatistik in der Bundesrepublik Deutschland ⁽²⁾ ⁽⁸¹⁾. Eine neue englische Studie zeigt, dass Schlaganfallerkrankungen mittlerweile die Nummer eins der häufigsten vaskulären Erkrankungen sind und damit die kardiovaskulären Erkrankungen ablösen ⁽⁷³⁾. Die entstehenden Langzeitfolgen durch bleibende funktionelle Einschränkungen sorgen für den größten Verlust an eigenständigen Lebensjahren in den westlichen Ländern und führen dadurch im Gesundheitssystem zu immensen Kosten ⁽⁷⁴⁾. Aus diesen Gründen gewinnt die Forschung im Hinblick auf die Optimierung von Therapiekonzepten und einer damit verbundenen besseren Prognose der Patienten zunehmend an Bedeutung.

Unter dem Begriff des Schlaganfalls werden sowohl zerebrale Durchblutungsstörungen im Sinne einer Ischämie, als auch zerebrale Blutungen zusammengefasst. Mehr als 80 % der Schlaganfälle sind ischämischer Genese ⁽⁵⁹⁾.

1.1.2. Die Therapie des ischämischen Hirninfarktes

Neben der Basistherapie mit Maßnahmen wie zum Beispiel Blutdruck- und Blutzuckereinstellung, Oxygenierung und geeigneter Lagerung ⁽⁹²⁾, gilt die systemische Lysetherapie mit rekombinantem Gewebs-Plasminogen-Aktivator (rt-PA = engl. recombinant tissue plasminogen activator) unter den zur Verfügung stehenden Lysetherapeutika als Mittel der Wahl beim akuten

ischämischen Hirninfarkt. Wie sich in klinischen Studien gezeigt hat, ist der Einsatz von rt-PA nur für ausgewählte Patienten in einem Zeitfenster von ca. 3 Stunden nach Beginn der Symptomatik sinnvoll, die zugelassene Dosis liegt hier bei 0,9 mg rt-PA/kg Körpergewicht ^{(10) (23) (24) (84)}. Die häufigste unerwünschte Wirkung dieser Behandlung ist die Zunahme von intrazerebralen Blutungen. In der 1997 veröffentlichten Studie der NINDS (National Institute of Neurological Disorders) ⁽⁸⁵⁾ ist das Risiko, nach einer Behandlung mit rt-PA eine intrazerebrale Blutung zu erleiden mit 6,4 % im Vergleich zu 0,6 % bei unbehandelten Patienten signifikant erhöht ⁽⁸⁵⁾. Es gilt deshalb, bei jedem Patienten individuell zwischen Nutzen und Risiko der Behandlung mit rt-PA abzuwägen ^{(82) (83)}.

1.1.3. Die zerebrale Ischämie

Zerebrale Ischämie bedeutet die Verminderung oder Unterbrechung der Durchblutung des Gehirns. Es wird pathophysiologisch zwischen globaler und fokaler zerebraler Ischämie unterschieden. Eine globale Ischämie betrifft das gesamte Gehirn. Man unterscheidet hier die anämische Ischämie, wie sie durch einen Herz-Kreislaufstillstand oder einen starken Blutdruckabfall verursacht wird, von der hyperämischen Ischämie, zu der es zum Beispiel im Rahmen einer Strangulation kommen kann ⁽³³⁾. Die sehr viel häufigere Form ist die fokale Ischämie. Sie tritt in umschriebenen Gefäßterritorien des Gehirns auf. In ca. 60 - 80 % der Fälle liegt eine thrombotische oder embolische Okklusion einer Hirnarterie als Ursache vor ^{(25) (78)}. Die daraus resultierende Minderdurchblutung bewirkt in den betroffenen Arealen des Gehirns einen Sauerstoff- und Glucosemangel. Abhängig von Art und Dauer der Minderversorgung kommt es zu Veränderungen im Gleichgewicht des Hirnstoffwechsels, was zu schweren metabolischen und morphologischen Veränderungen auf zellulärer Ebene führt. Zum Beispiel kann durch den Energiemangel das Membranpotential nicht mehr aufrecht erhalten werden. Eine Dysregulation spannungsabhängiger Kanäle mit

unkontrolliertem Ionenstrom und Ödembildung ist die Folge. Außerdem kommt es zur Aktivierung proteolytischer Prozesse und somit zur Zerstörung zytoskeletaler Proteine ^{(13) (14)}.

Neben dem zellulären Geschehen zeigt sich eine Beeinträchtigung der mikrovaskulären Integrität, die sich in einem Abbau der mikrovaskulären Basalmembran manifestiert ^{(11) (29) (30)}. Die zerebrale Ischämie hat damit, neben den Wirkungen auf zellulärer Ebene, einen pathologischen Effekt auf die im Ischämiegebiet liegenden Mikrogefäße. Das heißt, dass zusätzlich zum Parenchymschaden ein vaskulärer Schaden zu beobachten ist.

Die Ischämie selbst, und im weiteren Sinne auch die anschließende Reperfusion, setzt zunächst intravaskuläre Prozesse in Gang, die letztlich die strukturelle Integrität der Blut-Hirn-Schranke substantiell schädigen und weitere Parenchymschäden nach sich ziehen ^{(1) (11) (91)}.

1.1.4. Die Reperfusion

Für den durch die Ischämie entstehenden Parenchymschaden ist neben der eigentlichen Minderdurchblutung des zerebralen Gewebes auch die darauf folgende Reperfusion entscheidend. Die Rekanalisation der verschlossenen Gefäße und die dadurch entstehende Reperfusion ermöglichen die Wiederherstellung des physiologischen Blutflusses. Dies zieht aber auch schädigende Effekte auf Hirngewebe und Stoffwechsel nach sich ^{(1) (91)}. Neben der exogen eingeleiteten Rekanalisation, wie zum Beispiel im Rahmen einer Lysetherapie als therapeutische Maßnahme, kommt es innerhalb von Stunden bis Tagen auch zu einer spontanen Reperfusion. Diese endogene Thrombolyse ist sehr variabel und hängt von vielen Faktoren, wie zum Beispiel von Größe, Zusammensetzung und Lokalisation des Thrombus ab ⁽¹⁾. Primär liegt der Nutzen der Rekanalisation offensichtlich in der Wiederherstellung einer ausreichenden Versorgung mit Sauerstoff und Glucose, so dass genügend

Energie für den regelrechten Ablauf der physiologischen Stoffwechselprozesse durch die Wiederaufnahme der aeroben Glykolyse bereitgestellt werden kann ⁽⁶⁹⁾. Neben diesem positiven Effekt werden aber auch biochemische Prozesse aktiviert, die schädigende Auswirkungen haben. Diese Phänomene wurden bereits mehrfach beschrieben und unter dem Begriff „Reperfusionsschaden“ zusammengefasst ^{(35) (37) (91)}. Als wichtiger Faktor für das Ausmaß des Reperfusionsschadens gilt der zeitliche Abstand vom Beginn der Ischämie bis zur Reperfusion ⁽²²⁾. Dies ist vor allem bei der exogen getriggerten Reperfusion im Sinne einer Lyse als Therapieansatz nach akutem ischämischen Schlaganfall von Bedeutung.

1.2. Das mikrovaskuläre System

Für die Entstehung hämorrhagischer Veränderungen infolge einer zerebralen Ischämie wird der Alteration der vaskulären Integrität eine entscheidende Rolle zugeschrieben ⁽²⁹⁾. Die mikrovaskuläre Integrität wird hauptsächlich durch zwei Faktoren aufrecht erhalten, wobei erst Gefäße mit einem Durchmesser kleiner als 100 µm ⁽²⁸⁾ als Mikrogefäße bezeichnet werden (siehe Abbildung 1) ⁽¹⁹⁾. Zum einen durch die Blut-Hirn-Schranke (engl. = blood-brain-barrier, im Folgenden BBB) und zum anderen durch die Basalmembran ⁽²⁹⁾, welche von einigen Autoren auch direkt als Bestandteil der BBB angesehen wird ⁽⁴⁾.

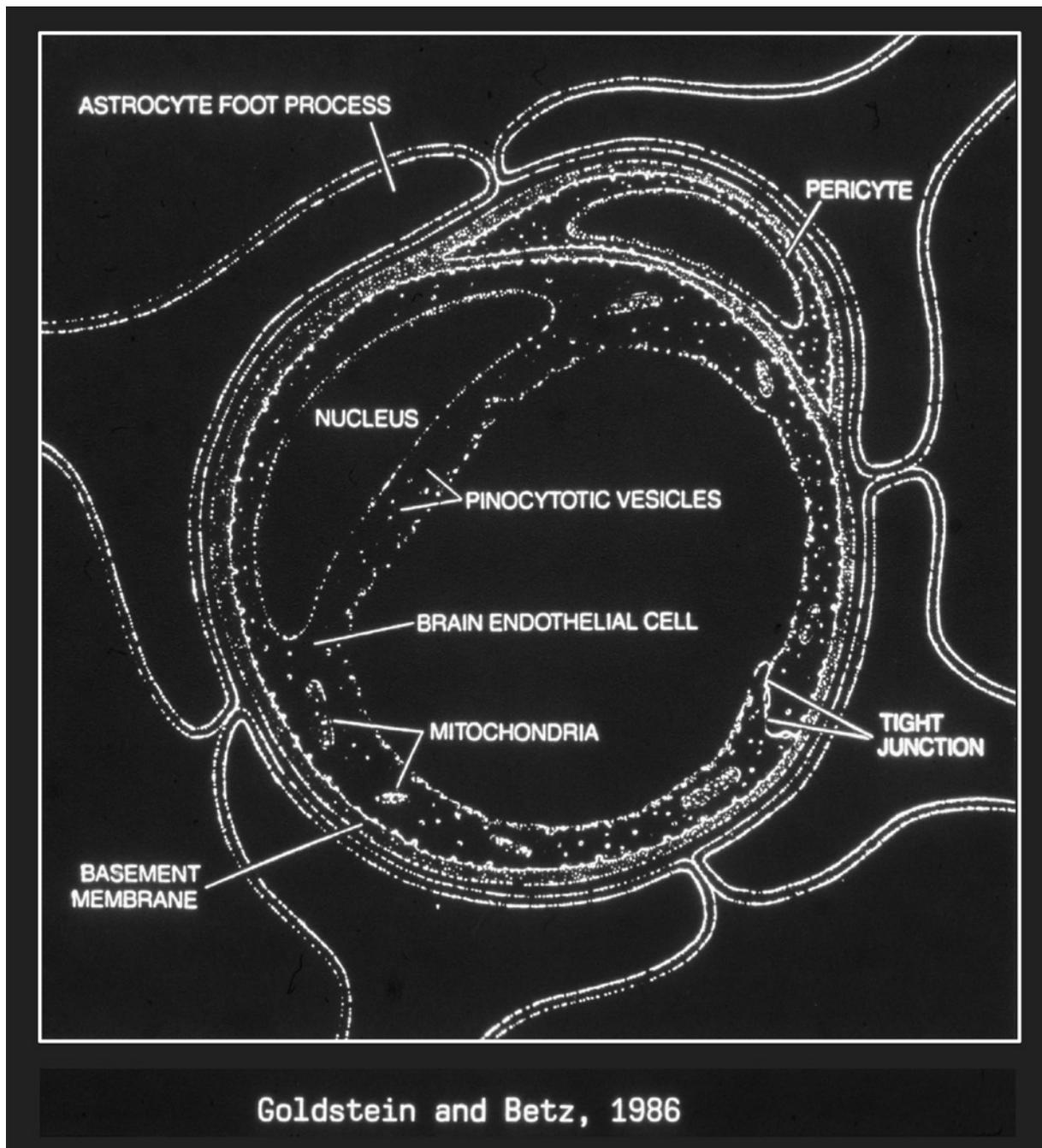


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Mikrogefäßes (Goldstein GW, Betz AL, 1986).

Histologisch betrachtet konstituiert sich die BBB aus einem Zusammenspiel verschiedener zellulärer Komponenten. Von Bedeutung sind hier Endothelzellen, Astrozyten, Perizyten sowie perivaskuläre Makrophagen ⁽⁴⁾. Die wichtigste Barriere für die Regulation der mikrovaskulären Permeabilität wird dabei durch die tight-junctions ⁽⁷¹⁾ des Endothels gebildet, welche induziert durch Astrozytenfortsätze ⁽⁶⁴⁾ besonders dichte Interzellularverbindungen darstellen (siehe Abbildung 3). So entsteht für ansonsten kapillargängige Stoffe eine selektive Schranke, die nur Partikel unter zwei Nanometer passieren lässt ⁽⁶⁸⁾. Der Transport niedermolekularer Substanzen wie Sauerstoff, Glucose oder bestimmter Transmitter kann somit erfolgen, wohingegen höhermolekulare Substanzen und Organismen an dem Eintritt in das empfindliche Hirnparenchym gehindert werden ^{(68) (86)}. Neben den beschriebenen zellulären Komponenten spielt die Basalmembran für die Erhaltung der mikrovaskulären Integrität eine besondere Rolle. Die Basalmembran besteht in ihren Hauptkomponenten aus Kollagen IV, Laminin und Fibronectin sowie Entaktin, Nidogen und Heparansulfat ⁽⁹⁵⁾ (siehe Abbildung 2).

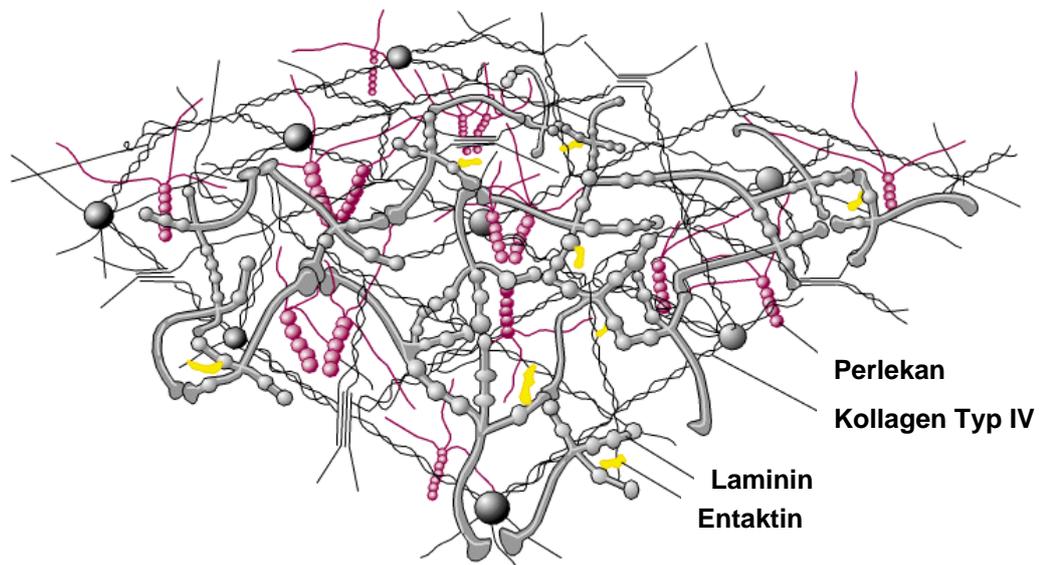


Abbildung 2: Modell der Basalmembran (Yurchenco PD, Schittny JC, 1990).

Die Basalmembran ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix (engl. = extra-cellular-matrix, im Folgenden ECM) und fungiert als polymeres Gerüst. Sie dient als Interaktionsmatrix für verschiedene Proteine, die an der interzellulären Adhäsion bzw. Kohäsion beteiligt sind. Durch die Vernetzung von Proteinen wie Laminin, Entactin, Perlekan, Fibronectin und Kollagen wird somit die Impermeabilität der zellulären Bestandteile der BBB funktionell optimiert ⁽⁹⁵⁾ und neben der Strukturhaltung die Filterfunktion für Proteine und zelluläre Bestandteile verstärkt ⁽⁵⁸⁾ (siehe Abbildung 2).

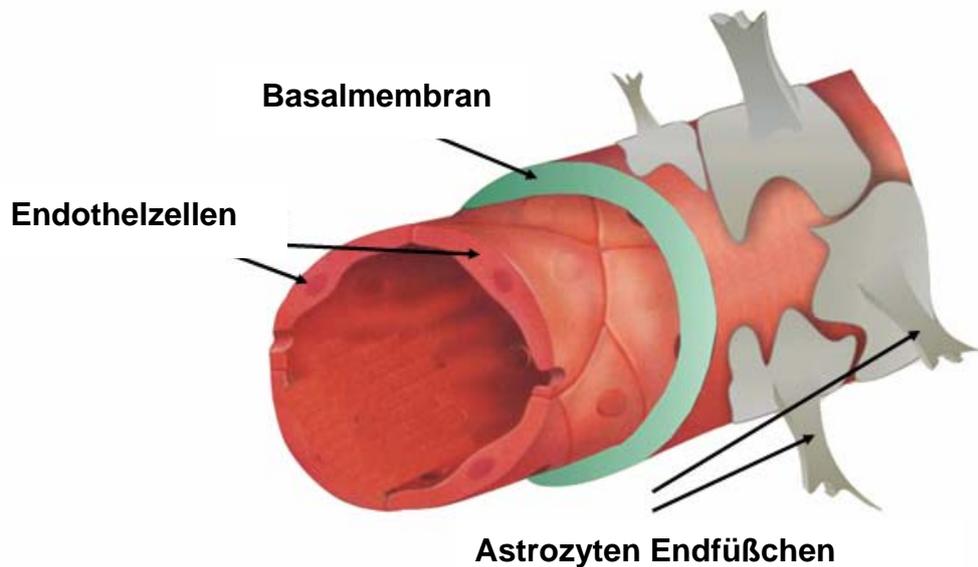


Abbildung 3: Schematische Darstellung der mikroanatomischen Verhältnisse eines Mikrogefäßes mit zellulären Anteilen der BBB und der Basalmembran (Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. M. Vosko, Abteilung für Neurologie, Allgemeines Krankenhaus, Linz, Österreich).

Das Auftreten von mikrovaskulären Blutungen nach zerebraler fokaler Ischämie scheint vor allem durch die Zerstörung der Basalmembran verursacht zu sein⁽²⁷⁾. Hamann et al. (1995) konnten beobachten, dass nach zerebraler Ischämie die Beeinflussung der mikrovaskulären Integrität für die Entstehung des Parenchymschadens eine entscheidende Rolle spielt. In Tierversuchen an Pavianen⁽³⁰⁾ und Ratten⁽²⁶⁾ wurde der Abbau von Bestandteilen der Basalmembran wie zum Beispiel Kollagen und die daraus resultierende Alteration der mikrovaskulären Integrität nach zerebraler Ischämie gezeigt. Neben dem Einfluss auf die Entstehung mikrovaskulärer Blutungen durch die

geschädigte Basalmembran, kommt es außerdem zu einer Beeinträchtigung ihrer strukturerhaltenden Funktion für die zellulären Bestandteile der BBB (siehe Abbildung 3). In der Folge können für das empfindliche Hirngewebe toxische Substanzen passieren.

Der Mechanismus dieses Abbaus beruht auf verschiedenen proteolytischen Kaskaden, durch die die Bestandteile der Basalmembran enzymatisch abgebaut werden. Neben verschieden anderen Enzymen, wie zum Beispiel Matrix-metalloproteinasen oder der Elastase ⁽¹⁷⁾ ⁽⁷²⁾, spielt die Serinprotease Plasmin beim Abbau der Basalmembran eine zentrale Rolle ⁽⁵⁶⁾ ⁽⁶⁶⁾.

1.3. Die Fibrinolyse

1.3.1. Das Plasminogen-Plasmin-System

An der Regulation der Thrombusentstehung sind zwei konkurrierende Systeme maßgeblich beteiligt: Blutgerinnung und Fibrinolyse (siehe Abbildung 4). Für die Blutgerinnung sind die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin und eine anschließende Vernetzung von Fibrinmonomeren der entscheidende Mechanismus. Für die Fibrinolyse ist das Plasminogen-Plasmin-System der bestimmende Faktor. Beide Systeme sind voneinander abhängig und stehen in einem physiologischen Gleichgewicht ⁽⁷⁵⁾.

Blutgerinnung und Fibrinolyse

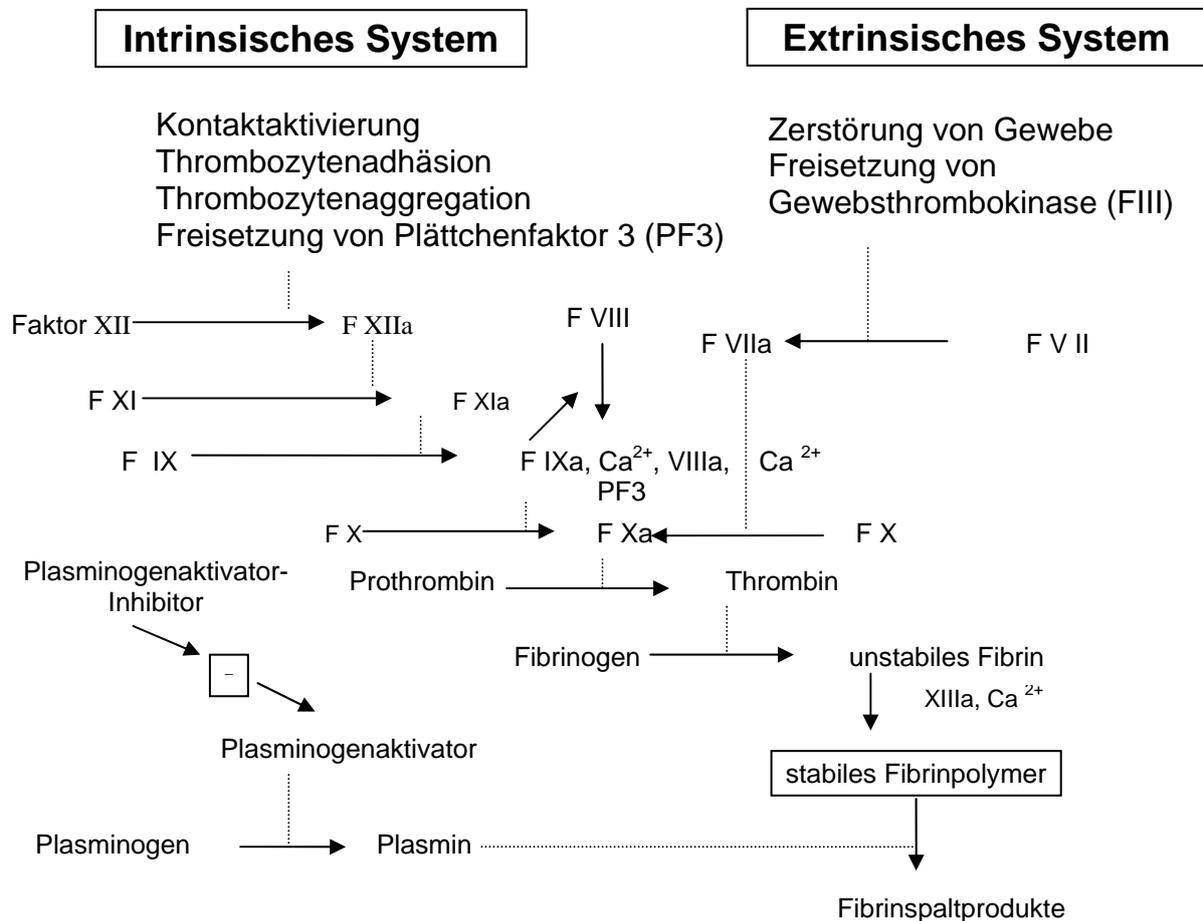


Abbildung 4: Schema zur Blutgerinnung und Fibrinolyse (Schmidt RF, Thews G, Physiologie des Menschen, 1997).

Bei einer Ischämie wird das Plasminogen-Plasmin-System durch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel tPA (= Geweb plasminogenaktivator) und uPA (= Urokinase), endogen aktiviert. Diese Enzymkaskade soll hier näher betrachtet werden, da sie neben dem positiven Effekt der Rekanalisierung auch an der Entstehung des mikrovaskulären Schadens infolge einer Ischämie maßgeblich beteiligt ist^{(56) (66)}. Im Rahmen einer allgemeinen fibrinolytischen Aktivität wird

Plasmin durch enzymatische Spaltung aus dem inaktiven Plasminogen aktiviert. Es wirkt einerseits in dem ischämisch geschädigten Bereich proteolytisch gegen prothrombotische Proteine, andererseits besitzt es zusätzlich gegenüber ECM-Proteinen wie Laminin und Fibronectin proteolytische Affinität. Auch Plasmin selbst kann die Basalmembran direkt angreifen. Darüber hinaus ist Plasmin sekundär an der enzymatischen Degradierung der ECM-Komponenten beteiligt, indem es weitere extrazelluläre Proteasen aktiviert, die sogenannten Matrix-metalloproteinasen (im Folgenden MMP). Diese spalten in unterschiedlicher Weise Proteine der ECM, was eine Verstärkung des strukturellen Schadens an der Basalmembran bedingt. Von besonderer Bedeutung sind hier die Isoformen MMP-2 und MMP-9, die wiederum Kollagen Typ IV und Laminin hydrolysieren⁽⁴⁸⁾. Der enzymatischen Aktivierung treten Inhibitoren wie PAI (= Plasminogen-Aktivator-Inhibitor) und TIMP (= Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) entgegen (siehe Abbildung 5).

- Plasminogen-Plasmin-System

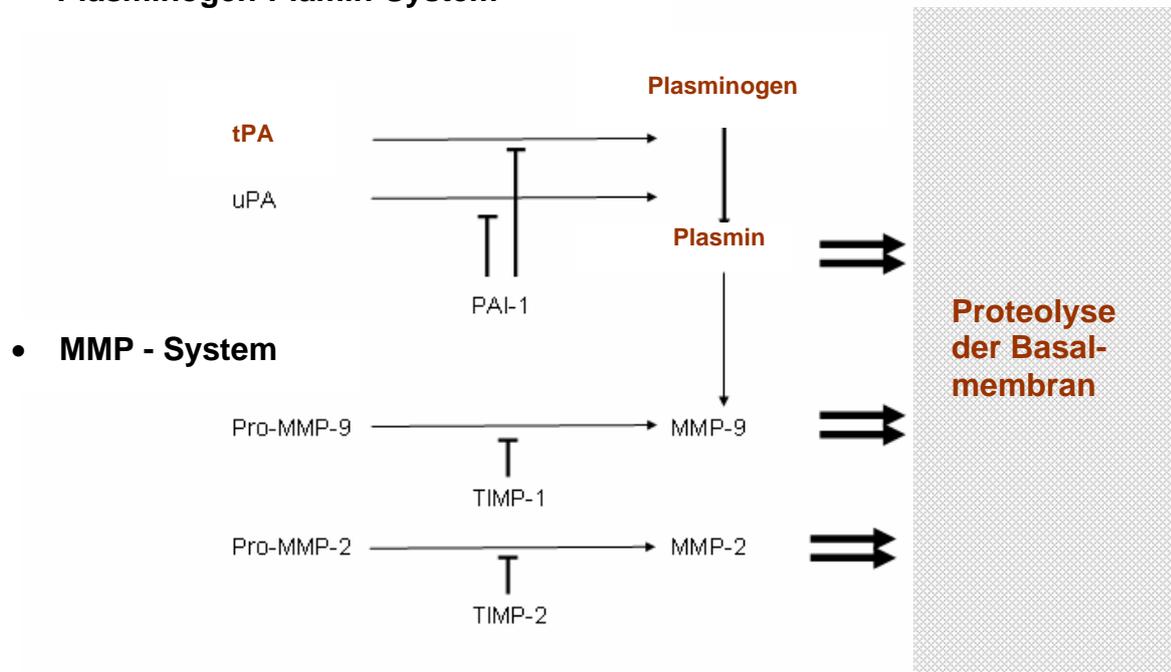


Abbildung 5: Proteolyse durch Aktivierung von Plasminogen und der Pro-Matrixmetalloproteinasen (MMP); TIMP = tissue inhibitor of MMP; PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1 (Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. D. Burggraf, Abteilung für Neurologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München).

Die Zerstörung der Basalmembran durch das Plasminogen-Plasmin-System wird einerseits mittels direkter Spaltung von Kollagen IV, Fibronectin und Laminin ^{(52) (53) (56)}, andererseits indirekt über die Aktivierung weiterer Enzymkaskaden verursacht. Dieser strukturelle Integritätsverlust der Basalmembran gilt als einer der Hauptfaktoren für die Ischämie-assoziierte Extravasation, das heißt die Ödembildung. Je nach Ausprägung des Ödems kann es zum Beispiel durch Gefäßkompression zu einer weiteren Abnahme der Durchblutung und zu einer Steigerung des Hirndrucks mit der Gefahr der Einklemmung kommen ⁽¹⁴⁾.

Ausgeprägte mikrovaskuläre Schäden führen zur Extravasation korpuskulärer Bestandteile des Blutes, also mikrovaskulären Blutungen ⁽²⁹⁾.

Diese Effekte sind in der Schlaganfalltherapie mit exogenen Plasminogen-Aktivatoren gefährlich, da sie durch verstärkte Lyse die Entwicklung von Blutungen zusätzlich begünstigen und verstärken ⁽²³⁾.

1.3.2. Rekombinant Tissue Plasminogen Aktivator (rt-PA)

Das in der systemischen Lysetherapie bei zerebraler Ischämie eingesetzte rt-PA (= Alteplase, zum Beispiel Actilyse[®], Boehringer Ingelheim, Deutschland) ist ein einkettiges Glykoprotein aus 355 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 39.000 Dalton ⁽⁷⁰⁾. Durch seine Spaltung von Plasminogen zu Plasmin wird auf dieselbe Weise wie durch endogenes t-PA die Fibrinolyse aktiviert. Über das freigesetzte Plasmin kommt es zur Spaltung von Fibrin und somit zur erwünschten Thrombolyse. Rt-PA hat sich, vor allem wegen seiner hohen Fibrinspezifität und seiner dosisabhängigen Thrombolyseaktivität, gegen andere Lysetherapeutika durchgesetzt ^{(21) (96)}.

1.4. Fragestellung

Im Rahmen der klinischen Lysetherapie sind, neben der thrombolytischen Aktivität des Plasmins, insbesondere die Effekte auf die Basalmembran, also auf die mikrovaskuläre Integrität, und im weiteren Sinne auf die Blut-Hirn-Schranke von Bedeutung. Für die Lysetherapie bei zerebraler Ischämie ist rt-PA das Mittel der Wahl. Dies wirft die Frage auf, inwieweit rt-PA die mikrovaskuläre Basalmembran beeinflusst.

Die Fragestellung dieser Arbeit war folgende:

- (1) Hat die intravenöse Gabe von rt-PA auf die Bestandteile der Basalmembran messbare Effekte ?

(2) Korreliert die Infarktgröße mit der verabreichten Menge von rt-PA ?

Als Versuchsmodell wählten wir ein Fadenmodell der fokalen Ischämie und Reperfusion in der Ratte. Es sollte untersucht werden, ob es durch die Gabe von exogenem rt-PA zu einer dosisabhängigen Abnahme der Mikrogefäßzahl als Ausmaß der mikrovaskulären Schädigung kommt. Darüber hinaus sollte der Einfluss von rt-PA auf die Infarktgröße beurteilt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Tierexperimentelles Modell

2.1.1. Versuchsaufbau

Für die Untersuchung der zerebralen Ischämie am lebenden Organismus wurden als Versuchstiere männliche Wistar Ratten (Charles River Laboratorien, Sulzfeld, Deutschland) gewählt. Alle Tiere hatten ein Alter zwischen vier und sechs Wochen mit einem Körpergewicht im Bereich von 250 g bis 350 g. Die Tiere wurden vor dem Eingriff mindestens über eine Woche akklimatisiert und in einem 12 Stunden Hell-/Dunkel-Rhythmus gehalten. In der Zeit vor und nach der Operation standen ihnen Wasser und Futter zur freien Verfügung. Die zerebrale, fokale und reversible Ischämie wurde experimentell mit Hilfe eines etablierten Fadenokklusionsmodell erzeugt^{(55) (80)}. Die Operation der Versuchstiere wurde von Herrn Dr. Dr. Helge K. Martens durchgeführt. Die anschließende Gewebsaufarbeitung und die immunhistochemischen Färbungen, sowie die digitale Weiterverarbeitung wurden von der Autorin als experimenteller Teil der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Bei diesem Modell wurde intraluminal ein Faden entlang des Verlaufs der linken Arteria carotis interna (engl. = internal carotid artery, im Folgenden ICA) soweit vorgeschoben, bis er den Abgang der linken Arteria cerebri media (engl. = middle cerebral artery, im Folgenden MCA) verlegte. Durch die daraus folgende Unterbrechung des Blutstroms wurde die Ischämie im zugehörigen Versorgungsgebiet der MCA erzeugt. Durch Belassen des Fadens in dieser Position wurde der ischämische Zustand über 3 Stunden konstant aufrechterhalten. Danach folgte eine 24 Stunden andauernde Reperfusion, die durch das Zurückziehen des Fadens in die ICA eingeleitet wurde.

Auf eine Laser-Doppler-Kontrolle zur Sicherung der zerebralen Ischämie wurde in dieser Versuchsreihe verzichtet. Eine Ischämiekontrolle mittels Laser-

Doppler war in vorausgegangenen Studien durch den Operateur Dr. Dr. Helge K. Martens durchgeführt worden⁽⁸⁰⁾, wobei sich das Fadenmodell als signifikant reproduzierbar gezeigt hatte und als etabliertes Modell gelten kann. Für diese Studie wurden vier experimentelle Gruppen zu jeweils sechs Tieren gebildet. Die erste Gruppe erhielt 30 Minuten vor Ablauf der Ischämiezeit intravenös eine niedrige Dosis von 0,9 mg rt-PA/kg Körpergewicht, die zweite Gruppe eine mittlere Dosis von 9 mg rt-PA/ kg Körpergewicht und die dritte Gruppe die hohe Dosis von 18 mg rt-PA/kg Körpergewicht. Die übrigen sechs Tiere dienten als Kontrollgruppe und bekamen eine isotonische Kochsalzlösung verabreicht.

2.1.2. Präparationsprotokoll des Fadenokklusionsmodells

Die Tiere wurden initial in einem Exsikkator topf für ca. 3-5 Minuten durch Äther-Begasung betäubt, dabei blieben die Schutzreflexe sowie die Spontanatmung erhalten. Sobald sich die Wirkung des Äthers bemerkbar machte, wurden die Tiere rasch dem Glasgefäß entnommen und gewogen. Aufgehängt an den Vorderzähnen wurden sie daraufhin in Rückenlage auf einer schrägen Ebene positioniert. Die Narkose wurde mit intraperitonealer Gabe von Thiopental (100 mg/kg Körpergewicht) eingeleitet, anschließend wurden die Versuchstiere tracheotomiert, mit einem Polyethylenschlauch (PE 250) intubiert und unter Gabe von Isofluran mit einem Gasgemisch aus 30 Vol % Sauerstoff, 60 % Stickoxydul (N₂O, Lachgas) und 1,5 – 1,7 Vol % Isofluran (entsprechend 0,2 l/min) künstlich beatmet. Je nach bestehenden Abwehrreflexen wurde zusätzlich ca. 1 l/min Lachgas (N₂O) verabreicht. Als Beatmungsgerät zur Ventilation wurde ein Harvard small animal ventilator (Modell 683, South Natick, MA) verwendet.

Die Tiere wurden bis zum Beginn der Reperfusion in Narkose gehalten. Mit Hilfe einer rektalen Temperatursonde, die über eine Rückkoppelung mit einem Heizkissen verbunden war, konnte die Körpertemperatur der Versuchstiere

während des gesamten Versuchs im Durchschnitt bei $37,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ gehalten werden. Zur Kontrolle des Blutdruckes wurde die Schwanzarterie von ventral frei präpariert, ein Dauerkatheter (PE 50 = Polyethylen 50 mm) gelegt und an einen Stratham P23-Druckwandler angeschlossen. Zum Offenhalten des Schlauchs, sowie zur bedarfsweisen Volumensubstitution wurde außerdem ein Perfusor (Perfusor ED 1-300, B-Braun) mit ca. 2 ml/h 0,9 % Kochsalzlösung angeschlossen. Zu Beginn der Operation und anschließend alle 0,5 bis 1 Stunde wurde zur Bestimmung der arteriellen Blutgase (Analysator: Chiron diagnostics, Aying, CIBA-Corning; 278 Gas System) Blut aus der Schwanzarterie entnommen.

Die Operation zur Induzierung von Ischämie und Reperfusion wurde nach dem Protokoll von Longa et al., modifiziert nach Sporer et al.^{(55) (80)}, durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein intravaskuläres Fadenokklusionsmodell. Der Zugang erfolgte über eine mediale Inzision 0,5 cm links vom Sternum bis ca. 2 cm nach kranial. Nach dem Darstellen der beiden Schilddrüsenlappen wurde vorsichtig nach links lateral in die Tiefe präpariert. Die linke Arteria carotis communis (engl. = common carotid artery, im Folgenden CCA) wurde bis zu ihrer Bifurkation in die ICA und die Arteria carotis externa (engl. = external carotid artery, im Folgenden ECA) dargestellt. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Schonung des Nervus vagus gerichtet. Während des Vorgangs stand zur präziseren Arbeit ein Operationsmikroskop mit einer 60,5-fachen Vergrößerung bereit. Um von intraluminal den Abgang der MCA aus der ICA zu verschließen, wurde ein 3 cm langer, monofilärer Prolenefaden (Ethicon 4/0; Ethicon, Deutschland) mit einer Silikonspitze verwendet. Über eine kleine Inzision, knapp proximal der Bifurkation der CCA, wurde dieser Faden in das Gefäßlumen eingebracht und dann langsam ~ 18-20 mm in den intrakraniellen Teil der ICA vorgeschoben (siehe Abbildung 6). Sobald der vaskuläre Widerstand merklich anstieg, wurde der Vorschub gestoppt.

In diesem Zustand der experimentell erzeugten Ischämie im Bereich der MCA verblieben alle Versuchstiere für 3 Stunden. Während der gesamten Ischämiedauer blieben die Tiere narkotisiert, die Wunde wurde offen belassen und mit einer mit Kochsalz getränkten Kompresse feucht gehalten.

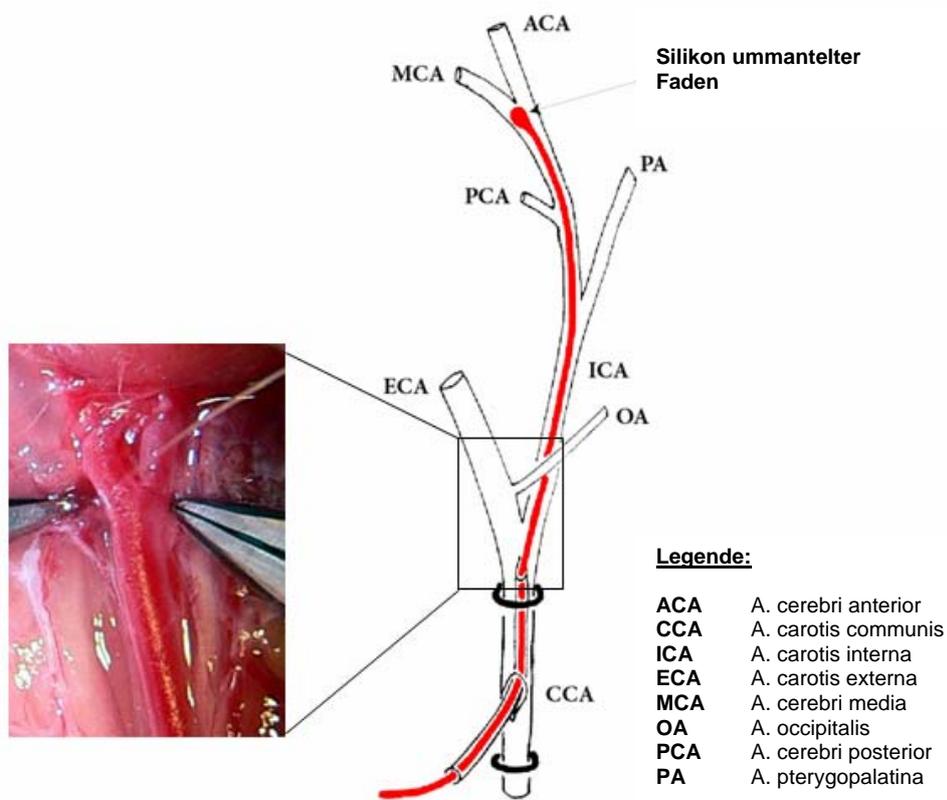


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Fadenvorschubs über die Arteria carotis communis bei der Ratte.

2.1.3. Administration von rt-PA

Für die simulierte Lyse wurde rt-PA (Actilyse[®], Boehringer Ingelheim, Deutschland) in unterschiedlichen Dosierungen verwendet. 2,5 Stunden nach Beginn der Ischämiezeit wurde über einen Verweilkatheter (PE 50) intravenös in die rechte Vena jugularis externa rt-PA in einer Dosis von 0,9 mg, 9 mg oder 18 mg rt-PA/kg Körpergewicht infundiert. Die genaue Menge rt-PA wurde je nach Körpergewicht des einzelnen Versuchstieres berechnet, abgewogen und auf eine Gesamtmenge von 1 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten 1 ml physiologische Kochsalzlösung ohne Zusatz von rt-PA. Analog der in der klinischen Praxis üblichen Vorgehensweise wurden zuerst 10 % der zu verabreichenden Dosis über 5 Minuten als Bolus, die verbleibenden 90 % kontrolliert über 1 Stunde mit Hilfe eines Perfusors (Precidor 5003 INFORS AG, Basel, Schweiz) als Dauerinfusion verabreicht.

2.1.4. Reperfusion

Eine halbe Stunde nach der Bolusgabe, nach insgesamt 3 Stunden Ischämiezeit, wurde der Faden um 4-5 mm zurückgezogen und hiermit die Reperusionsphase eingeleitet. Nach einer weiteren halben Stunde, somit am Ende der rt-PA Infusion, wurde die Narkosephase beendet. Während der 24 Stunden dauernden Reperusionszeit blieben die Tiere in ihren Käfigen, Wasser und Futter standen zur freien Verfügung.

2.1.5. Herstellung der Hirnschnitte

Nach Ablauf der Reperusionszeit wurden die Tiere erneut gewogen und im Anschluss mit Trapanal tief narkotisiert. Nach der Durchführung von Thorakotomie und Perikarderöffnung wurden die Ratten mit ~ 200 ml einer

Lösung aus BSA (= bovines Serumalbumin) (10 g/l), Heparin (10 U/l) und 2 ml/l Nitroprussid (1,8 g/l), gelöst in 1000 ml physiologischer Kochsalzlösung, transkardial perfundiert. Nach dem Tod der Tiere wurden die Rattenhirne nach schonender, oberflächiger Reinigung, durch Herausschälen mit einem Löffel von frontal entnommen. Danach wurden die Hirne für einige Sekunden in - 20 °C kaltes Isopentan getaucht, bis sie eine feste Konsistenz erlangten. Anschließend wurden die Präparate in entsprechenden Schälchen in Tissue tec (Leica Microsystems) eingebettet und abermals in Isopentan eingetaucht, diesmal bei einer Temperatur von – 80 °C. Die anschließende Lagerung erfolgte bei – 80 °C.

Zur weiteren Verarbeitung der Hirne wurden, unter Verwendung eines Kryostats bei - 16 °C bis - 20 °C 10 µm dicke Schnitte des gesamten Hirns angefertigt. Alle 50 Schnitte, entsprechend alle 500 µm, wurden 2 Schnitte entnommen und auf jeweils einem Glasobjektträger platziert. Im Bereich von 0,0 mm bis ± 1,0 mm vom Bregma, dem Schnittpunkt von Kranz - und Pfeilnaht am Vorderkopf, wurden sämtliche 10 µm-Schnitte auf Objektträger aufgebracht.

Die stereotaktischen Koordinaten für diese Arbeit richteten sich nach dem Atlas von Paxinos & Watson⁽⁶³⁾.

2.2. Immunhistochemie

2.2.1. Prinzipien der Färbungen

Der mikrovaskuläre und neuronale Schaden wurde mit zwei verschiedenen immunhistochemischen Methoden bestimmt.

Mit Hilfe eines aus Ziegen gewonnenen Antikörpers gegen Kollagen IV (DUNN, Southern Biotechnology Associates, Inc., USA) konnte die Basalmembran sichtbar gemacht werden. Die zweite Färbung wurde mit einem aus Hasen gewonnenen Antikörper (Chemicon Int.; USA) gegen das Strukturprotein MAP-2 (= Mikrotubulin assoziiertes Protein 2) durchgeführt,

dessen Abbau ein frühes Zeichen einer Zellschädigung ist ⁽³⁴⁾. Durch Demarkierung bzw. durch fehlende Anfärbung im Bereich der Ischämie bei Verlust des MAP-2, konnte der Infarkt vom gesunden Hirngewebe abgegrenzt werden.

2.2.2. Kollagenfärbung

Für die Kollagenfärbung wurden Schnitte aus der Mitte des betroffenen Areals, der Bereich um das Bregma $\pm 1,0$ mm, verwendet.

Im ersten Schritt wurden die bei -80 °C gefrorenen und gelagerten Hirnschnitte über ca. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach erfolgte die Fixierung mit einer 1:1 Mischung aus Aceton und Chloroform über 5 Minuten mit anschließendem Lufttrocknen über 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend folgten 5 Minuten Spülen mit 10 mmol/l Glycin in einer mit Phosphaten gepufferten Salzlösung (= PBS: 8,3 mmol/l Na_2HPO_4 ; 3,2 mmol/l KH_2PO_4 und 123 mmol/l NaCl gelöst in 1000 ml destilliertem Wasser, eingestellt auf einen pH von 7,4). Danach wurden die Schnitte dreimal über 5 Minuten mit reinem PBS gespült. Bei Raumtemperatur folgte nun über 20 Minuten die Inkubation mit Blotto (Blotto: 50 g fettlose Trockenmilch, 1 ml Pferdeserum und 0,3 mmol/l Natriumazid gelöst in 1000 ml TRIS Saline Stock = 38,5 mmol/l TRIS-HCl und 150 mmol/l NaCl gelöst in 1000 ml destilliertem Wasser), um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit dem Primärantikörper Anti-Kollagen Typ IV aus Ziege (DUNN, Southern Biotechnology Associates, Inc., USA) bei einer Verdünnung von 1:800 in „Reagent Dilution“ (= 50 ml TRIS Saline Stock, 20 mg BSA und 25 mg Thimerosal) für 2 Stunden bei 37 °C, anschließend für 12 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen in PBS wurden die Präparate 30 Minuten bei 37 °C mit dem biotinylierten Anti-Ziege IgG Sekundärantikörper aus Pferd inkubiert (Anti-Ziege, Jackson Immuno Research

Laboratories, West Grove, PA, U.S.A.). Der Antikörper wurde mit einer 1:200 PBS-Lösung, Pferdeserum und 10 % Tween (Merck 822184) verdünnt (5 µl Antikörper in 1 ml PBS, 15 µl Pferdeserum und 1 µl Tween 20). Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal über 10 Minuten mit PBS gespült. Für 20 Minuten erfolgte dann die Blockierung endogener Peroxidasen mit 10 % H₂O₂. Danach erfolgte eine Spülung über 3 Minuten unter Leitungswasser, gefolgt von 3 mal 5 Minuten in PBS. Danach wurden die Schnitte über 30 Minuten bei 7 °C mit dem Avidin-Biotin-Komplex inkubiert (Vectastain-Elite-Kit; Vector Laboratories; Konzentrationen entsprechend der Empfehlung des Herstellers). Nach erneutem Spülen in PBS und anschließendem kurzen Eintauchen in destilliertes Wasser wurde in Dunkelheit das Chromogens AEC (AEC: 3-amino, 9 ethyl-carbazole; Konzentrationen entsprechend der Empfehlung des Herstellers; AEC-Kit, Biomedica Corporation, USA) für 10 Minuten bei 37 °C zugesetzt. Danach wurden die Schnitte ein letztes Mal gespült und anschließend luftgetrocknet.

2.2.3. MAP-2-Färbung

Für die MAP-2-Färbung wurden Schnitte aus dem gesamten Verlauf der volumetrisch aufgeschnittenen Hirne entnommen, d.h. alle 500 µm.

Diese Methode folgte in den Grundzügen dem oben beschriebenen Protokoll der Kollagenfärbung. An der Stelle des Avidin-Biotin-Komplex wurde hier jedoch Streptavidin (Streptavidin: Dako, Denmark) verwendet. Außerdem wurde AEC durch DAB (DAB: 3, 3'-diaminobenzidine; Konzentrationen entsprechend der Empfehlung des Herstellers; DAB-Kit, Biomedica Corporation, USA) ersetzt. Als Primärantikörper diente ein MAP-2 Antikörper aus Hase (Chemicon Int., USA), als Sekundärantikörper ein biotinylierter Anti-Hase IgG Antikörper (Vector Lab.). Die Inkubationszeiten wurden entsprechend dem Kollagenprotokoll eingehalten. Diese Färbung ermöglichte die Darstellung der ischämischen

Hirnareale und somit die Visualisierung der Regions of Interest (ROIs) für die morphometrische Analyse, sowie für die Berechnung des Infarktolumens (siehe Abbildung 7).

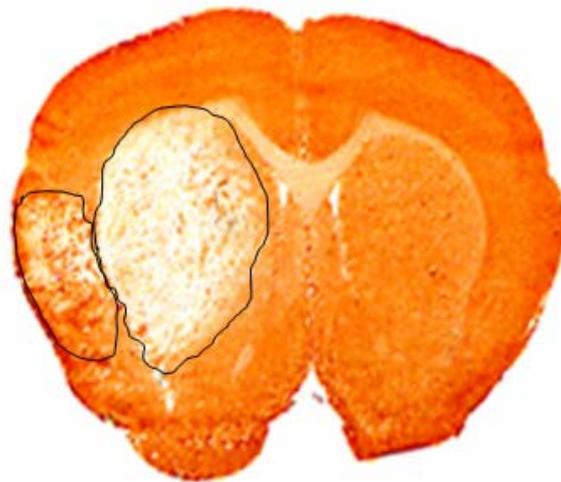


Abbildung 7: MAP-2-gefärbter und anschließend gescannter Hirnschnitt mit definierten ROIs (Regions of Interest).

2.3. Digitale Auswertung mit OPTIMAS

2.3.1. Arbeitsschritte

In Abbildung 8 sind die einzelnen Arbeitsschritte, die der Verarbeitung durch das computerunterstützte Auswerteprogramm OPTIMAS zugrunde liegen, schematisch aufgelistet.

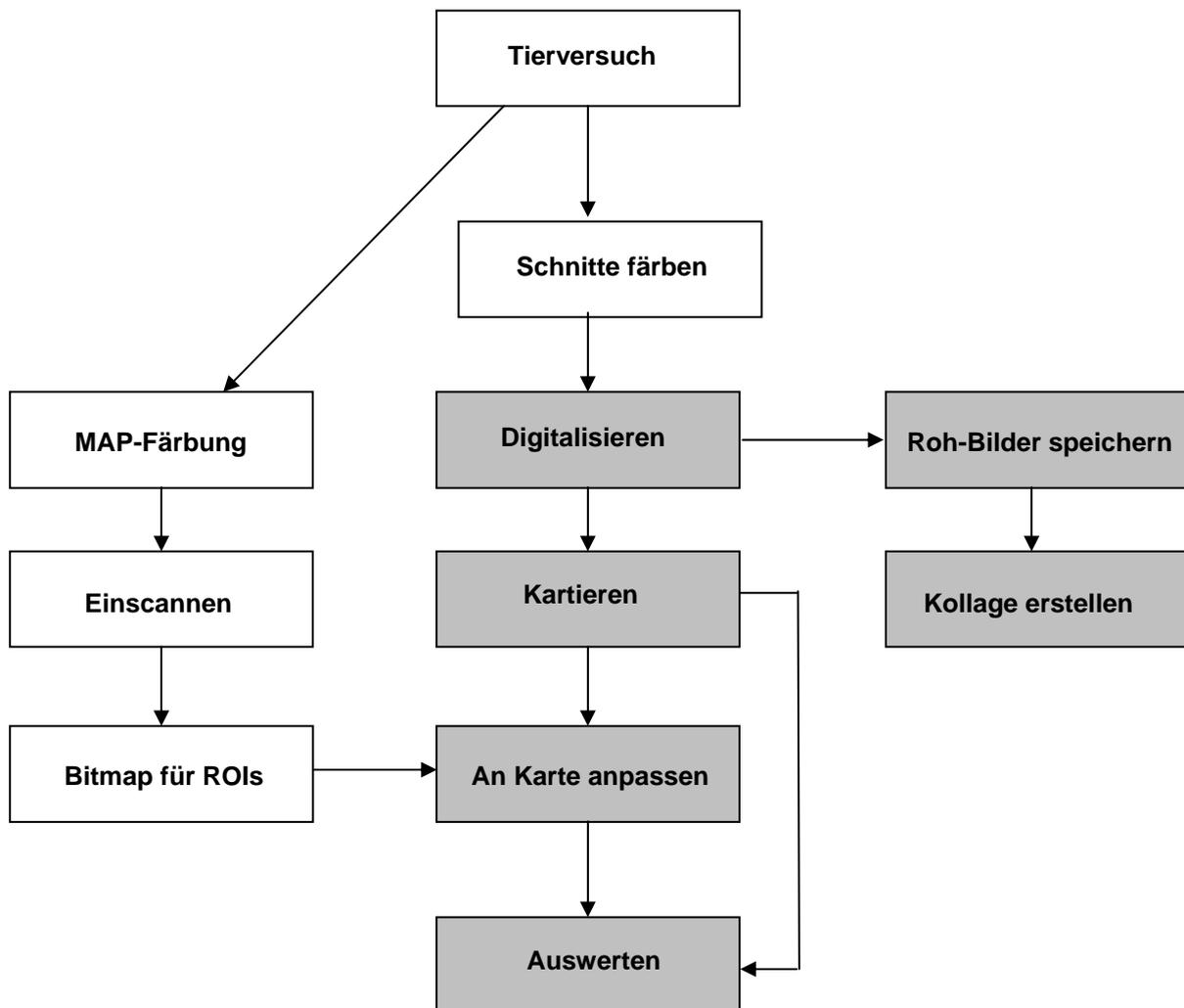


Abbildung 8: Schematische Übersicht über die einzelnen Versuchsschritte bis zur Optimas - Auswertung (Dr. C. Kloss, laboreigenes Manual, Ptolemäus V1.0.1, 2001).

2.3.2. Berechnung der Infarktvolumen

Da für die immunhistochemische Färbung mit dem MAP-2-Antikörper Schnitte aus allen Bereichen des volumetrisch aufgeschnittenen Hirns verwendet wurden, konnte der Infarkt nun in seinem Verlauf makroskopisch erkannt und die betroffenen Schnitte zu mikroskopischen Untersuchung bereitgestellt werden. Es wurden zur volumetrischen Berechnung des Infarktes somit der Bereich ab dem ersten Schnitt von frontal, in dem sich ein Infarktareal abgrenzen ließ, bis zum letzten Schnitt mit Demarkierung eines Infarktareals nach dorsal verwendet ⁽⁴⁴⁾. Zur genauen Berechnung des Infarktvolumens wurden die Schnitte im Bereich des ischämischen Areals sowie die daran angrenzenden Schnitte mit Hilfe eines konventionellen Flachbettscanners (Epson Perfection 1240U) digitalisiert. Das OPTIMAS 6.5 image analysis system (Media Cybernetics, L.P., Silver Spring, MD, U.S.A.) ermöglichte im nächsten Schritt die computergestützte Markierung der mit der MAP-2-Färbung demarkierten und damit dem Infarkt entsprechenden Areale in Kortex und Basalganglien, den sogenannten Regions of Interests (ROIs). Auf der kontralateralen, nicht-ischämischen Seite, wurden spiegelbildlich die entsprechenden Areale markiert. Die exakte Größe des Infarktgebietes (2-dimensional) wurde im nächsten Schritt mit Hilfe eines Algorithmus von OPTIMAS (genaue Beschreibung des Algorithmus: Kloss et al. 2002) ⁽⁴⁴⁾ berechnet. Unter Berücksichtigung der zwischen den einzelnen Hirnschnitten liegenden Distanzen konnte schließlich mit EXCEL (Microsoft '97) das Infarktvolumen (3-dimensional) berechnet werden.

2.3.3. Berechnung von Gefäßanzahl und Gefäßdichte

Die Gefäßanzahl, also die Anzahl der Mikrogefäße pro Flächeneinheit, sowie der prozentuale Anteil der angefärbten Gefäßfläche an der Gesamtfläche, hier entsprechend der Gefäßdichte, wurden im Infarktgebiet als auch in dem äquivalenten Gebiet in der kontralateralen, infarktfreien Hemisphäre bestimmt. Dazu wurden Anti-Kollagen IV gefärbte Schnitte aus dem mittleren Infarktteil mit einem Zeiss Axiophot Mikroskops bei 5-facher Vergrößerung und einer daran angeschlossenen Sony Power HAD 3CCD Videofarbkamera (Sony, Tokyo, Japan) digitalisiert und in das OPTIMAS-Programm importiert. Im nächsten Schritt wurde die ROI-Maske eines benachbarten und gescannten MAP-2 gefärbten Schnittes auf den Kollagen-Schnitt übertragen, mit dem Ergebnis einer sogenannten angepassten Karte (siehe Abbildungen 9 und 10). Die Berechnung der Gefäßanzahl sowie der Gefäßdichte im Infarktareal und im entsprechenden Gebiet der nicht-ischämischen Seite erfolgte anhand dieser Karte mittels OPTIMAS und EXCEL (Microsoft '97). Somit konnten die beiden Hemisphären in Relation zueinander gesetzt werden.

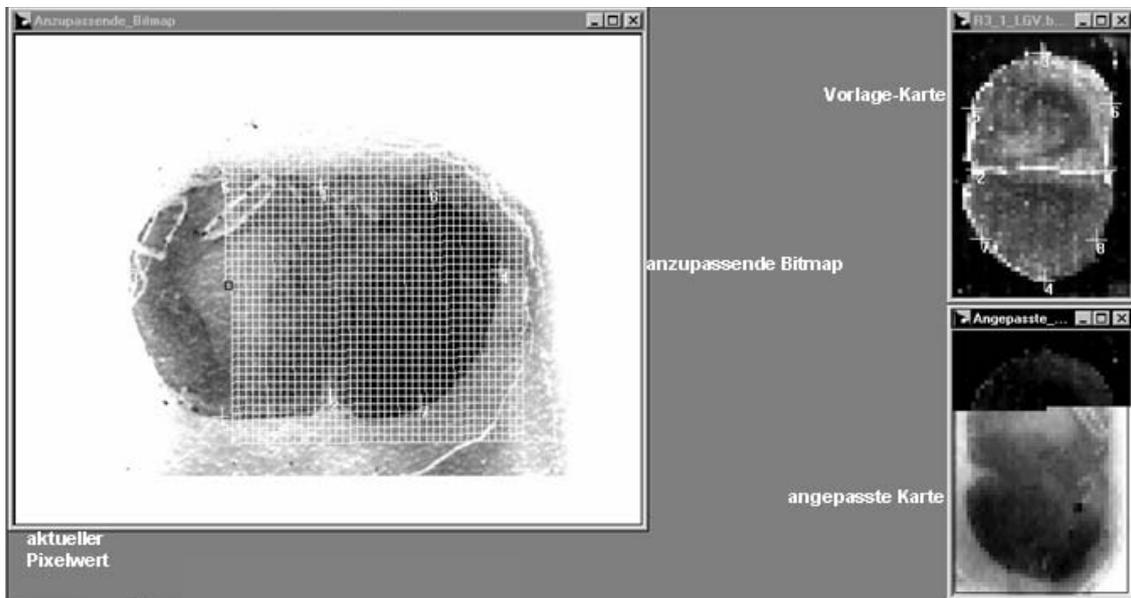


Abbildung 9: Optimas - Verarbeitung von Kollagenkarten (= Vorlage-Karte) und MAP-2-Karten (= anzupassende Bitmap) (Dr. C. Kloss, laboreigenes Manual, Ptolemäus V1.0.1, 2001).

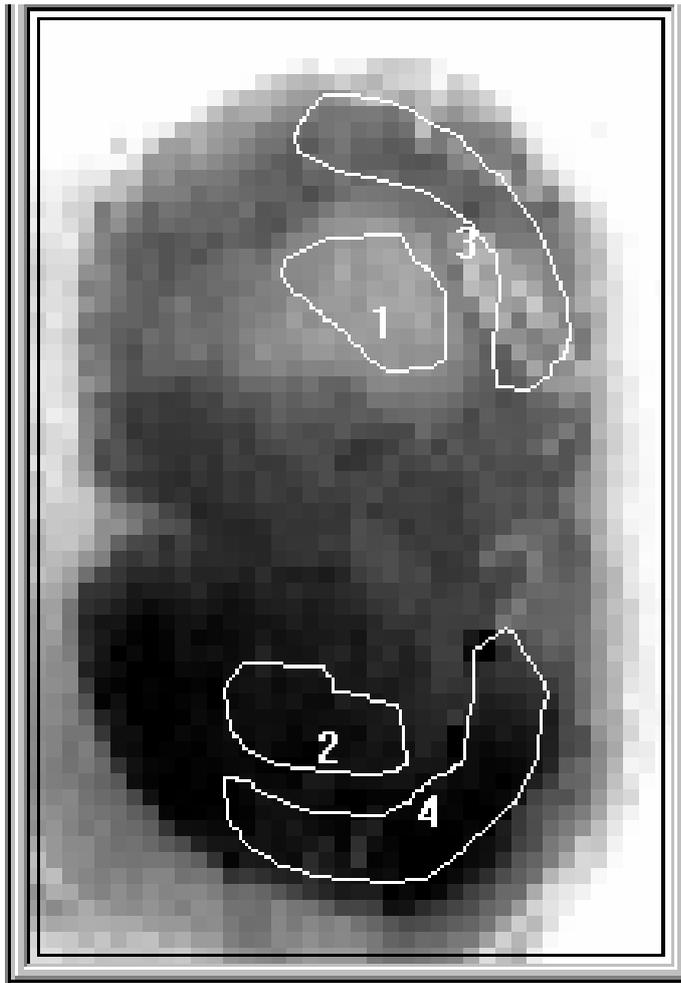


Abbildung 10: Auswertbare, angepasste Optimas - Karte mit eingezeichneten ROIs (Dr. C. Kloss, laboreigenes Manual, Ptolemäus V1.0.1, 2001).

2.4. Proteinisolierung und Western Blot

Ein semiquantitativer Nachweis des Kollagengehaltes erfolgte mittels Western Blot.

2.4.1. Versuchsprotokoll

Alle Arbeitsschritte der Proteinisolierung und Zentrifugation wurden bei 4 °C absolviert. Mit einem Skalpell wurden von den 10 µm Kryoschnitten gleich große Areale aus der ischämischen und der nicht-ischämischen Hemisphäre abgekratzt (siehe Abbildung 11). Diese Schnitte wurden aus Gründen der Standardisierung alle der Ebene ± 1 mm vom Bregma entnommen.

Pro Blot wurden sechs Objektträger mit jeweils zwei Hirnschnitten verwandt. Hierbei wurden zur Differenzierung zwischen Kortex und Basalganglien in beiden Hemisphären jeweils aus den entsprechenden Arealen Material isoliert, so dass pro Hirnschnitt vier separate Gewebeproben gewonnen wurden: Kortex ischämisch/nicht-ischämisch und Basalganglien ischämisch/nicht-ischämisch (siehe Abbildung 11).

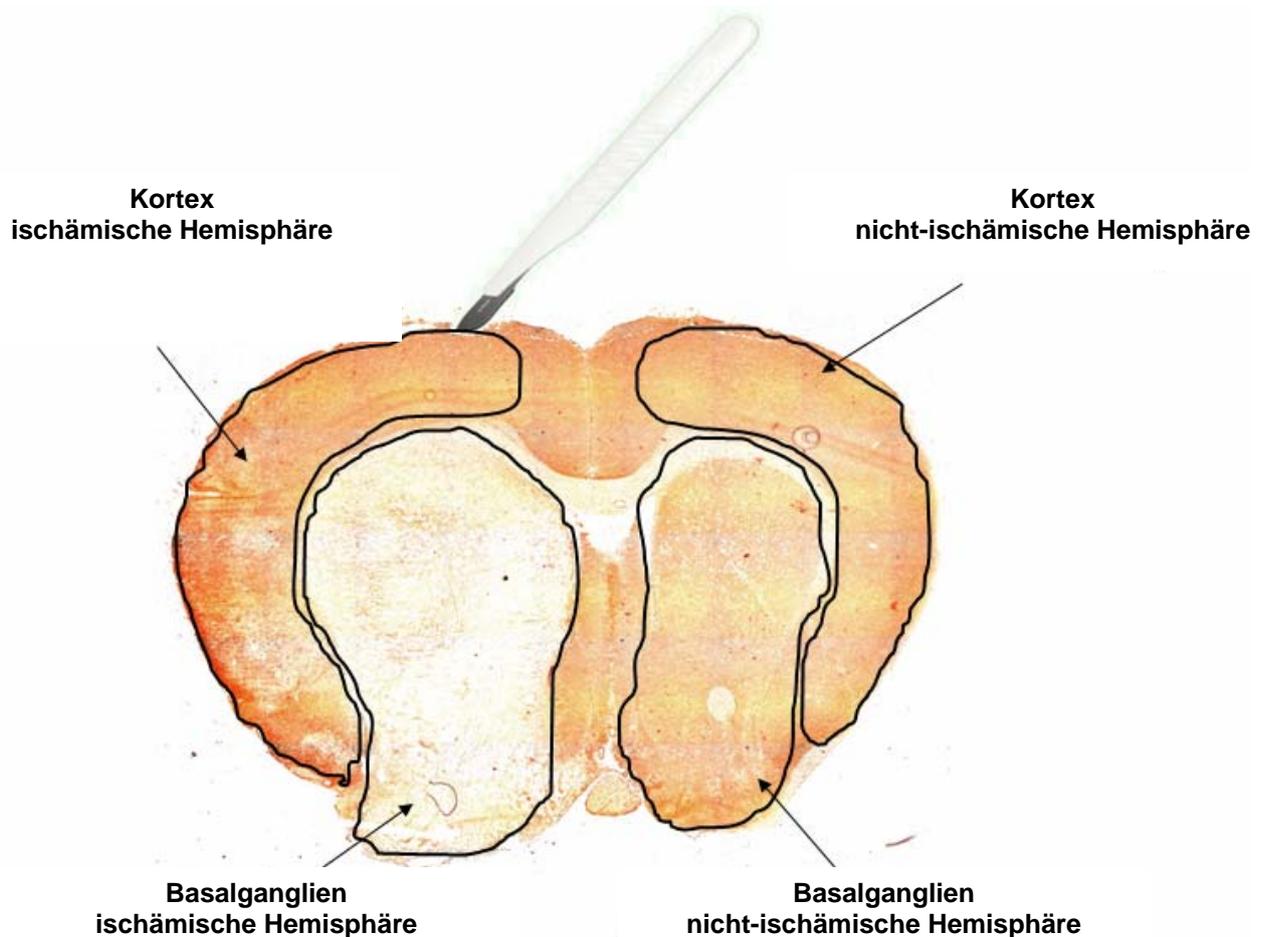


Abbildung 11: Schematische Darstellung zur Materialgewinnung aus den Hirnschnitten für die Western Blot-Analyse.

Für die Western Blot-Analyse wurde das so gewonnene Material zunächst über 2 Stunden in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt. Anschließend wurden die einzelnen Gewebeproben mit 500 μ l Homogenisierungspuffer (4 ml 20 mM Tris HCL, 3 ml 150 mM NaCl, 1 ml 5 mM EDTA, 1 ml 5 mM EGTA, 0,1 ml 1 mM DTT, 100 μ l PMSF [zur Vermeidung des Proteinabbaus], 1 ml 2 % SDS; pH 7,5; Temperatur: 2°- 4° Celsius) versetzt und anschließend unter Eiskühlung zermörsert. Das hieraus entstandene Homogenisat wurde bei 4 °C über 30

Minuten inkubiert und im Anschluss bei 4500 U/min über 10 Minuten zentrifugiert.

Der nun entstandene Überstand wurde in Mengen von 20 µl in Eppendorf Rörchen jeweils mit 5 µl Puffer nach Laemmli (Gemisch aus 188 ml Stock Solution [= 9 ml 0,5 M Tris/HCL {pH 6,8}, 4 g 15 % SDS, 20 ml H₂O, 13 g 45 % Glycerin, eine Spatelspitze 0,02 % Bromphenolblau] und 12 µl 2-Mercaptoethanol [Sigma, lot 062K0114]) verdünnt ⁽⁴⁶⁾.

Dieses Proteingemisch wurde im nächsten Schritt im Wasserbad über 5 Minuten gekocht und anschließend bei 14.000 U/min über 30 Sekunden zentrifugiert.

Die Proteinseparation erfolgte als SDS-PAGE (engl. = Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ⁽⁷⁾. Als Ionenpuffer für die Elektrophorese wurde dem Zentrifugat ein Einfach-SDS-Puffer zugegeben (aus 10-fach SDS-Puffer: 10 g SDS, 30 g Tris, 144 g Glycin; ad 1 l H₂O). Anschließend wurden die Elektrophoreseproben auf ein 10 % Acrylamidgel mit SDS aufgetragen und mit einer Laufzeit von 2 Stunden bei 100 V aufgetrennt. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels eines Bradford Protein Assays (TEBU GmbH, Deutschland) mit BSA als Standard ermittelt.

Die Proteine wurden nun mittels eines Transfer-Puffers (10 mM CAPS, pH 11,0 in 10 % Methanol) in einer Semi-Dry Anlage (Biorad) auf eine PVDF-Membran (= Polyvinylidendifluorid; Sequi-Blot; Biorad) mit einer Laufzeit von 1 Stunde bei 400 mA übertragen. Die Membranen wurden nach Immobilisation mit Ponceau S (Sigma, Germany) gefärbt, um die gleiche Proteinkonzentration in allen Proben zu überprüfen.

Zum Blocken der Blots wurde bei Raumtemperatur eine Lösung aus 3 % BSA in TBS (Tris buffered saline) mit zusätzlich 0,2 % Tween (TBST) über 1 Stunde verwendet. Danach wurde der Primärantikörper Anti-Kollagen Typ IV aus Ziege (Chemicon, USA) mit einer Verdünnung von 1:400 in einer Blockierlösung (3 % BSA in TBST) angesetzt und die Blots nach dem Auftragen über Nacht wiederum bei 4 °C inkubiert.

Danach folgte nach dreimaligem Waschen der Proben mit TBST über jeweils 10 Minuten die Inkubation mit dem biotinylierten Anti-Ziege IgG Sekundärantikörper (Vector Laboratories, Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:500 in TBST über 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem, dreimaligem Spülen mit TBST wurden die Proben bei Raumtemperatur über 30 Minuten mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain-Elite-Kit; Vector Laboratories; Burlingame, USA; Konzentrationen entsprechend der Empfehlung des Herstellers) inkubiert. Anschließend wurden die Blots erneut mit TBST gewaschen und mittels eines ECL Development KIT (Amersham Biosciences, UK) entwickelt.

2.4.2. Auswertung

Die verschiedenen Banden der Western Blots der einzelnen Gruppen wurden mit einem Scanner (Epson Perfection 1240U) digitalisiert und anschließend wurden die Kollagen IV positiven Banden mit Hilfe des optischen Analyse-Programms (TINA, Version 2.08, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Germany) densitometrisch quantifiziert. Die Resultate wurden auf einer arbiträren Optical Density–Skala (OD) abgebildet. Die Ergebnisse wurden als relative optische Dichte pro Mikrogramm Protein und pro Millimeter Bandbreite angegeben.

Zur Auswertung wurde, jeweils für Kortex und Basalganglien getrennt, das Verhältnis der ischämischen Seite zur nicht-ischämischen Seite bestimmt (siehe Abbildung 12).

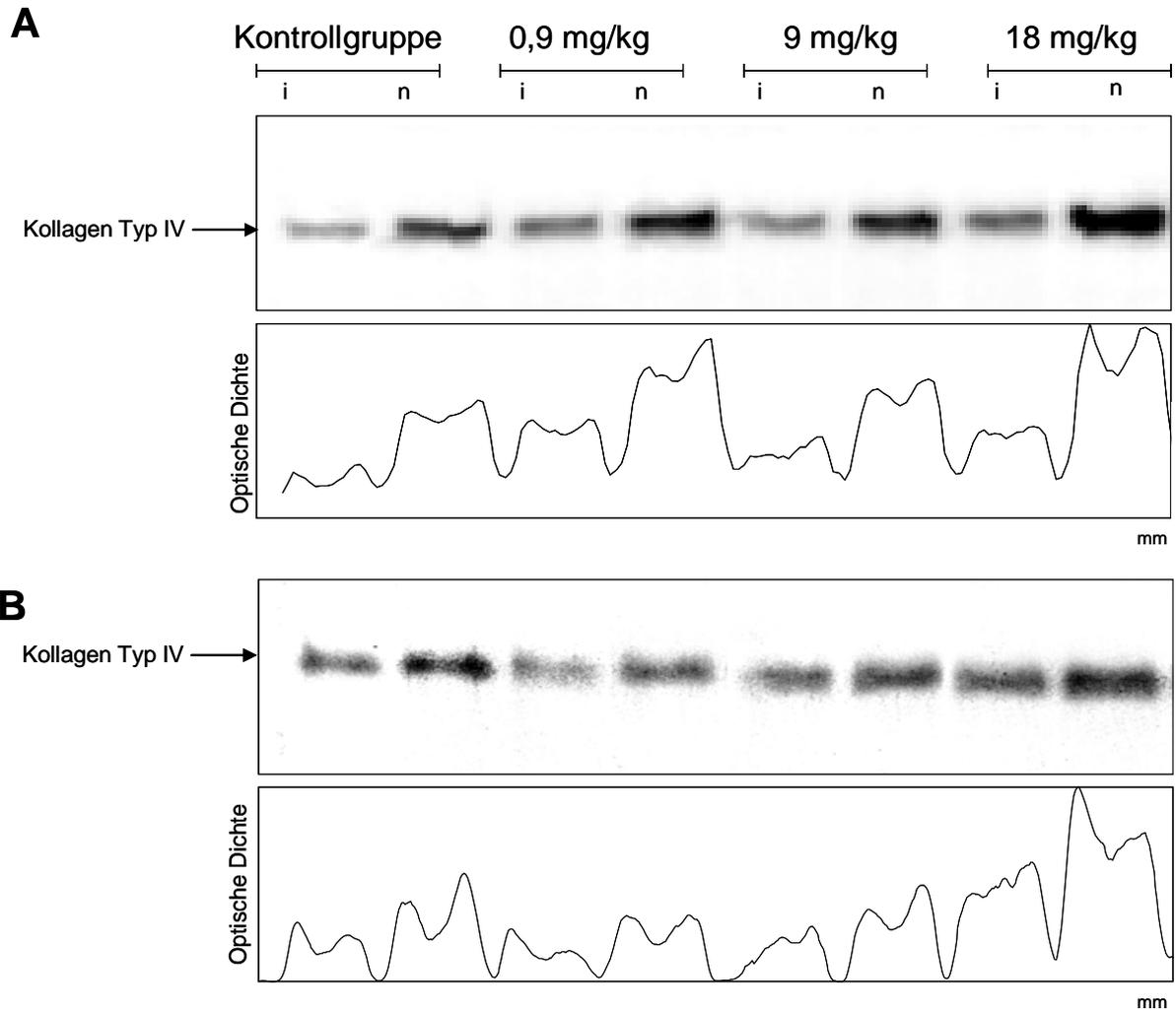


Abbildung 12: Darstellung der digitalisierten Western Blots und Abbildung der Resultate auf der Optical Density-Skala für je ein Tier (repräsentativ) aus den einzelnen Gruppen (n = 6); (A) Kortex, (B) Basalganglien, (i) ischämisch (n) nicht-ischämisch.

2.5. Statistik

Die Ergebnisse der Immunhistochemie und des Western Blots wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler vom arithmetischen Mittel dargestellt (SEM). Prozentangaben beziehen sich auf die kontralaterale, nicht-ischämische Hemisphäre. Die Ergebnisse der drei rt-PA-Versuchsgruppen wurden hinsichtlich ihrer Abweichung von der Kontrollgruppe mittels eines Student t-Test bei einem Signifikanzniveau von 0,05 verglichen.

Die Vergleiche zwischen den experimentellen Gruppen wurden mittels einer ANOVA (engl. = analysis of variance) bei einem Signifikanzniveau von 0,05 durchgeführt.

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden 40 Ratten entsprechend dem etablierten Faden-okklusionsmodell operiert. 34 Tiere überlebten den Versuch mit 3-stündiger Ischämie - und anschließender 24-stündiger Reperfusionszeit. Davon konnte bei 24 Tieren durch die MAP-2-Färbung eine zerebrale Ischämie nachgewiesen werden.

Folgende Gründe sind für das Versterben der einzelnen Tiere anzunehmen:

Zwei Tiere der 18 mg rt-PA-Gruppe erlitten eine große zum Tode führende Subarachnoidalblutung. Vier weitere Tiere, davon ein Tier aus der 18 mg rt-PA-Gruppe und insgesamt drei Tiere aus den anderen rt-PA-Gruppen, verstarben während der Operation, als Ursache ist hier am ehesten ein technischer oder operativer Fehler anzusehen (siehe Tabelle 1).

Bei zehn operierten überlebenden Tieren konnte keine Ischämie nachgewiesen werden: Vier dieser zehn Tiere hatten mit ~ 360 g im Vergleich zu den anderen Tieren ein relativ hohes Körpergewicht (davon ein Tier der 0,9 mg rt-PA-Gruppe, zwei Tiere der 9 mg rt-PA-Gruppe und ein Tier der Kontrollgruppe). Es wird vermutet, dass hier mit dem verwendeten Faden nur eine teilweise Okklusion gelungen war. Der genaue Mechanismus für das Ausbleiben der Ischämie muss offen bleiben. Bei den restlichen sechs Tieren ohne Infarkt, davon zwei Tiere aus der 0,9 mg rt-PA-Gruppe und vier Tiere aus der 18 mg rt-PA-Gruppe, kommt eventuell eine über die Norm ausgebildete Kollateralisierung als Mechanismus in Betracht (siehe Tabelle 1).

In die Studie wurden aus den unterschiedlichen Versuchsgruppen nur Ratten mit zerebraler Ischämie eingeschlossen und nur deren Hirnschnitte für die weiteren Tests verwendet. Jede der vier Versuchsgruppen erhielt also sechs Tiere.

Tabelle 1: Auflistung der Versuchstiere

	operierte Tiere	verstorbene Tiere	Tiere mit Infarkt	Tiere ohne Infarkt
Kontrolle	7	0	6	1
0,9 mg rt-PA	11	2	6	3
9 mg rt-PA	9	1	6	2
18 mg rt-PA	13	3	6	4
Gesamt	40	6	24	10

3.1. Immunhistochemie

3.1.1. Infarktvolumen

Es wurde der Mittelwert des Infarktvolumens für die einzelnen Versuchsgruppen berechnet. Hieraus ergab sich für die Gruppe, die rt-PA in der niedrigsten Dosierung von 0,9 mg rt-PA/kg Körpergewicht erhalten hatte, ein mittleres Volumen von $102,6 \pm 16 \text{ mm}^3$. Für die Gruppe, die 9 mg rt-PA/kg Körpergewicht erhalten hatte, $101,2 \pm 17 \text{ mm}^3$ und für die Tiere, die 18 mg rt-PA/kg Körpergewicht erhalten hatten, $133,0 \pm 24 \text{ mm}^3$.

Mit einem durchschnittlichen Volumen von $165,2 \text{ mm}^3$ zeigten die Kontrolltiere die größten Infarkte. Bei den Gruppen, die eine niedrige bzw. mittlere Dosis von rt-PA erhalten hatten, zeigte sich verglichen mit der Kontrollgruppe eine signifikante Reduzierung des Infarktvolumens (t-Test, $p < 0,05$). Die Hochdosisgruppe mit 18 mg rt-PA/kg Körpergewicht hatte innerhalb der rt-PA-Gruppen im Mittel die größten Infarkte, im Vergleich mit der Kontrollgruppe ergab sich eine Reduktion des Infarktvolumens (t-Test, nicht signifikant, $p = 0,11$).

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Infarktvolumetrie dargestellt.

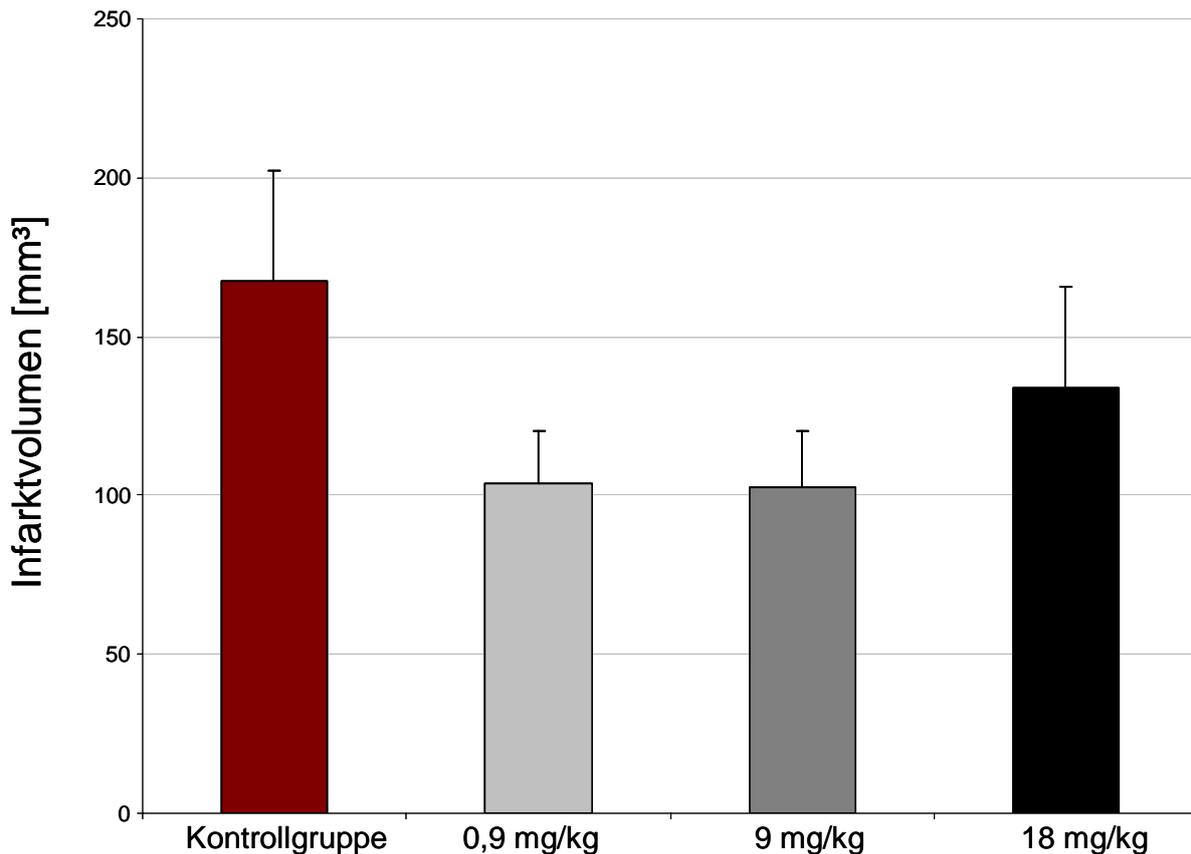


Abbildung 13: Darstellung der Infarktgröße als Mittelwert \pm Standardfehler für jede der vier Gruppen ($n = 6$) als Funktion der jeweiligen rt-PA Dosis.

*** = $p < 0,05$ (t-Test versus Kontrollgruppe); n.s. = nicht signifikant**

(t-Test versus Kontrollgruppe); ANOVA $p < 0,05$.

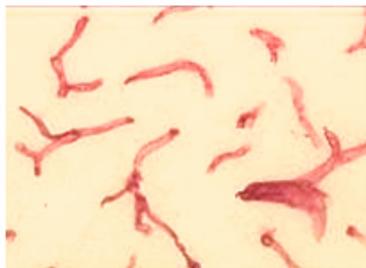
3.1.2. Der Einfluss von rt-PA auf die Mikrogefäße

Mikrogefäße sind definiert als Blutgefäße mit einem Durchmesser kleiner als 100 μm . Die berechnete Anzahl der Mikrogefäße auf der ischämischen Seite wurde zur Anzahl der Mikrogefäße auf der infarktfreien Seite in Relation gesetzt. Ebenso wurde mit der berechneten Gefäßdichte verfahren. Die Anzahl der Gefäße auf der infarktfreien Seite entspricht damit 100 %. Es wurden die

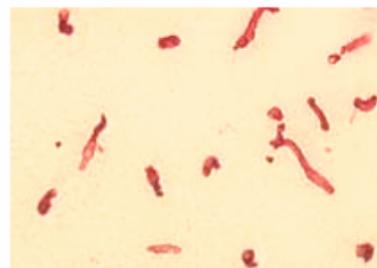
Regionen der Basalganglien (BG) und des Kortex (CX) untersucht und jeweils die ischämische mit der nicht-ischämischen Hemisphäre verglichen.

Sowohl Gefäßanzahl als auch die Gefäßdichte zeigte in allen Gruppen auf der ischämischen Seite eine signifikante Abnahme im Vergleich zur gesunden Hemisphäre (gepaarter t-Test mit einem Signifikanzniveau $p < 0,05$). In Abbildung 14 sind zur Veranschaulichung korrespondierende Ausschnitte der ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre im Bereich der Basalganglien eines mit Kollagen IV gefärbten Hirnschnittes dargestellt.

Kollagen Typ IV Immunhistochemie



**Basalganglien
nicht-ischämische Hemisphäre**



**Basalganglien
ischämische Hemisphäre**

Abbildung 14: Ischämische und nicht-ischämische, korrespondierende Bereiche in den Basalganglien nach Kollagen-IV- Färbung.

Für die 0,9 mg rt-PA-Gruppe ergab sich im Mittel eine Abnahme der Gefäßanzahl auf der ischämischen Hemisphäre von 18 ± 3 % im Gebiet der Basalganglien (BG) und 10 ± 4 % im Kortex (CX) gegenüber der nicht-

ischämischen Kontrollseite. Für die Gruppe mit 9 mg rt-PA/kg Körpergewicht fand sich eine Reduzierung der Gefäßzahl von 21 ± 4 % (BG) bzw. 13 ± 7 % (CX) und in der Hochdosisgruppe mit 18 mg rt-PA/kg Körpergewicht eine Abnahme von 22 ± 4 % (BG) bzw. 15 ± 8 % (CX). In der Kontrollgruppe war eine Reduktion um 17 ± 3 % in den Basalganglien und von 12 ± 7 % im Kortex zu beobachten.

In Abbildung 15 ist das Verhältnis der Anzahl der Mikrogefäße der ischämischen zur nicht-ischämischen Seite dargestellt. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in den Mittelwerten der drei mit rt-PA behandelten Gruppen nachweisen (t-Test; $p > 0,05$).

Vergleicht man jeweils die Mittelwerte der drei mit rt-PA behandelten Gruppen mit der Kontrollgruppe zeigte sich keine Signifikanz im t-Test ($p > 0,05$).

Im Bereich der Basalganglien zeigte sich in allen Gruppen ein größerer Verlust der Anzahl der Gefäße als im Kortex. Dies war in den Gruppen mit 0,9 und 9 mg/kg rt-PA signifikant ($p < 0,05$, Basalganglien versus Kortex; t-Test). Das Ergebnis der Anzahl der Mikrogefäße im Kortex in Abhängigkeit von der verabreichten rt-PA Dosis zeigte, dass die Abnahme der Gefäßanzahl bei niedriger rt-PA Dosis geringer ist. (ANOVA, signifikant mit $p = 0,001$).

Gefäßanzahl

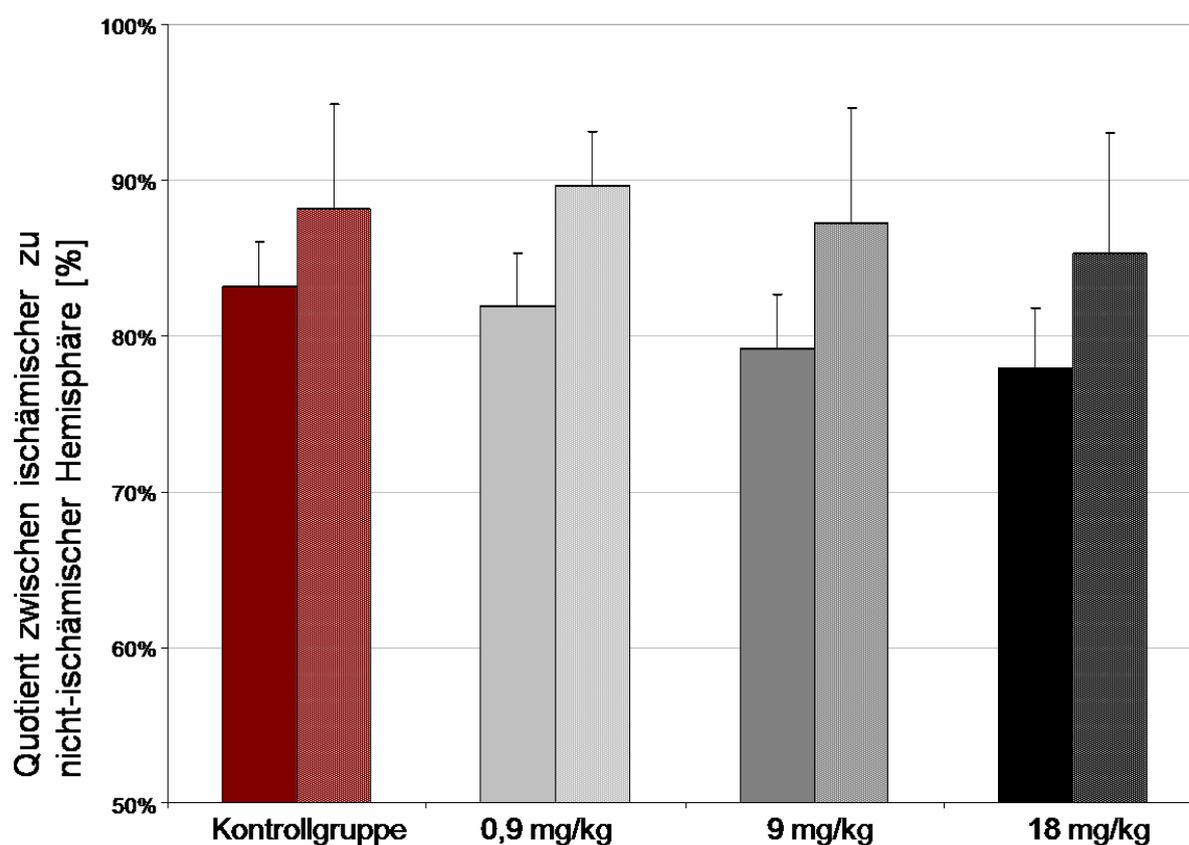


Abbildung 15: Gefäßanzahl der ischämischen Seite in Relation zur kontralateralen Seite als Funktion der rt-PA Dosis für Basalganglien und Kortex, angegeben als Mittelwert \pm SEM (jeweils $n = 6$). ANOVA Varianzanalyse für Mittelwerte im Kortex aller Gruppen $p = 0,001$; Basalganglien = nicht signifikant.

In einem weiteren Schritt der Auswertung wurde neben der Anzahl auch die Gefäßdichte betrachtet. Dabei wurde die absolute Fläche (= engl. total stained area), hier also die Gesamtheit der angefärbten Gefäße im Verhältnis zum Gesamtareal bestimmt. Die Ergebnisse der ischämischen Seite wurden wiederum in Relation zur gesunden Hemisphäre gesetzt.

Es ergab sich auf der ischämischen Seite für die 0,9 mg rt-PA/kg Körpergewicht Gruppe eine Abnahme der Gefäßdichte um 23 ± 2 % (BG) und 7 ± 4 % (CX). In

der 9 mg rt-PA-Gruppe betrug die Abnahme $28 \pm 4 \%$ (BG) und $15 \pm 4 \%$ (CX). In der Gruppe, die 18 mg rt-PA/kg Körpergewicht erhalten hatte, zeigte sich eine Abnahme der Gefäßdichte um $29 \pm 4 \%$ (BG) und $17 \pm 5 \%$ (CX). In der Kontrollgruppe war die Gefäßdichte im Vergleich zur gesunden Hemisphäre um $25 \pm 4 \%$ (BG) und $14 \pm 7 \%$ (CX) vermindert.

In Abbildung 16 werden die Mittelwerte der Gefäßdichte der ischämischen Hemisphäre für die einzelnen Versuchsgruppen, unterteilt in Basalganglien und Kortex, in Relation zu der entsprechenden nicht-ischämischen Hemisphäre dargestellt.

Der Effekt ist dem oben gezeigten Ergebnis der Gefäßzahl nach Ischämie und Reperfusion ähnlich. In allen Gruppen fand sich in den Basalganglien eine signifikant stärkere Abnahme von Gefäßanzahl und Gefäßdichte als im Kortex (gepaarter t-Test mit einem Signifikanzniveau $p < 0,05$). In der Gruppe, in der die Tiere 0,9 mg rt-PA/kg Körpergewicht erhalten hatte, fand sich eine geringere Gefäßabnahme im Kortex als in den anderen Gruppen. Für diese Gruppe wurde sowohl für die Basalganglien als auch für den Kortex die geringste Abnahme der Gefäßdichte verzeichnet.

Gefäßdichte

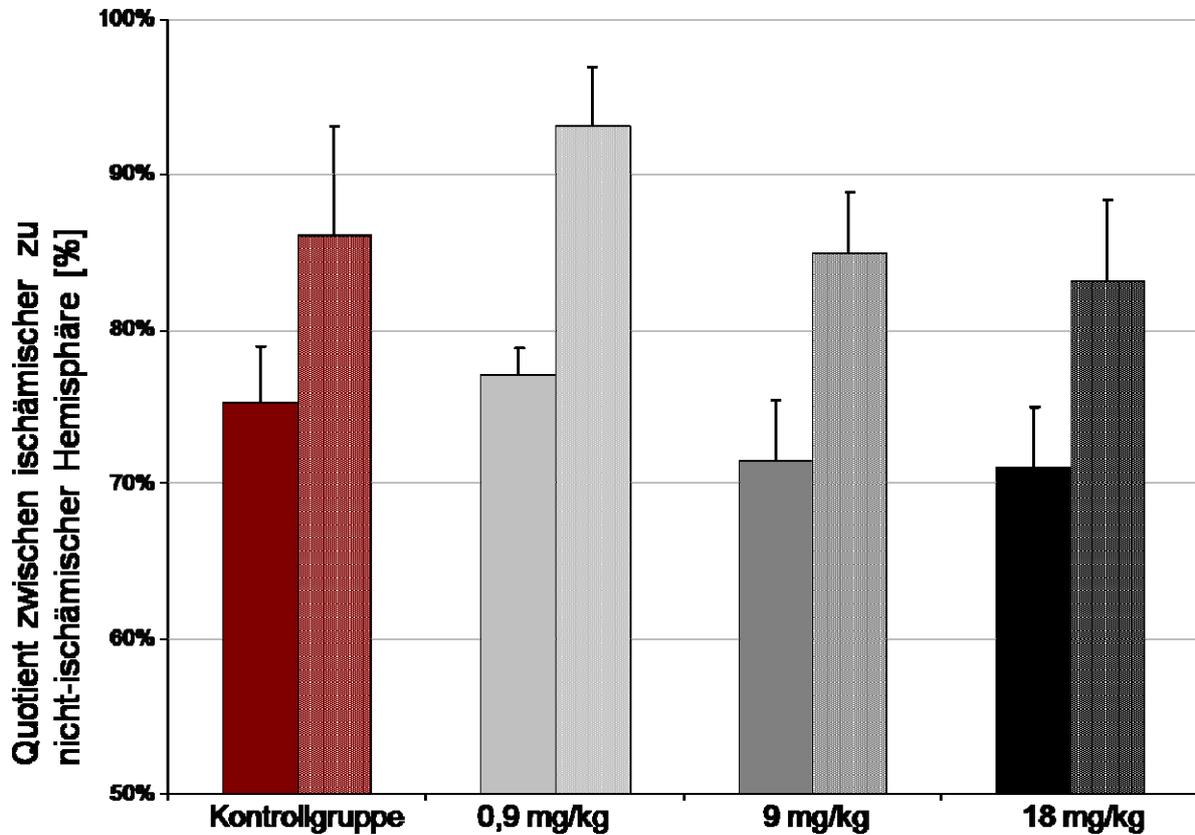


Abbildung 16: Gefäßdichte der ischämischen Seite in Relation zur kontralateralen Seite als Funktion der rt-PA Dosis für Basalganglien und Kortex, angegeben als Mittelwert \pm SEM (jeweils $n = 6$). ANOVA Varianzanalyse für Mittelwerte im Kortex und den Basalganglien aller Gruppen $p < 0,05$.

3.2. Western Blot

Die Banden des Western Blots wurden gescannt und anschließend auf einer OD-Skala (OD = Optical density) dargestellt.

Die Auswertung des Western Blots für Anti-Kollagen Typ IV zeigte in allen Versuchsgruppen in Kortex und Basalganglien eine signifikante Abnahme des Gehaltes an Kollagen IV nach 3-stündiger Ischämie (ANOVA, $p \leq 0,05$).

In der Kontrollgruppe ergab sich auf der ischämischen Seite eine Abnahme des Kollagengehaltes auf 64 ± 2 % im Kortex (CX) und auf 43 ± 4 % in den Basalganglien (BG) im Vergleich zur infarktfreien Hemisphäre (jeweils $p < 0,001$, t-Test).

In der Gruppe mit der geringsten rt-PA Dosis zeigte sich mit einer Reduktion auf 89 ± 3 % im Kortex (t-Test: $p = 0,011$ versus Kontrollgruppe; jeweils $n = 6$) und 79 ± 1 % in den Basalganglien (t-Test: $p = 0,0002$ versus Kontrollgruppe; jeweils $n = 6$) ein signifikant geringerer Kollagenverlust im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenso war die Kollagenreduktion auf 81 ± 5 % im Kortex (t-Test: $p = 0,003$ versus Kontrollgruppe; jeweils $n = 6$) und 72 ± 4 % in den Basalganglien (t-Test: $p = 0,003$ versus Kontrollgruppe; jeweils $n = 6$) in der Gruppe der Tiere, die 9 mg/kg Körpergewicht erhalten hatten, signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. In der Hochdosisgruppe hingegen zeigte sich ohne signifikante Abweichung von der Kontrollgruppe eine deutliche Abnahme des Kollagengehaltes auf 59 ± 4 % im Kortex (t-Test: nicht signifikant versus Kontrollgruppe; jeweils $n = 6$) und 57 ± 4 % in den Basalganglien (t-Test: nicht signifikant versus Kontrollgruppe; jeweils $n = 6$) der ischämischen Hemisphäre in Relation zur nicht-ischämischen Hemisphäre. Es fand sich hier ein signifikanter Unterschied zu den Gruppen mit 0,9 mg/kg Körpergewicht und 9 mg/kg Körpergewicht (t-Test: $p < 0,05$). Die Ergebnisse sind in Abbildungen 17 für die einzelnen Versuchsgruppen als Funktion der jeweils verabreichten rt-PA Dosis dargestellt.

Kollagen Typ IV Western Blot

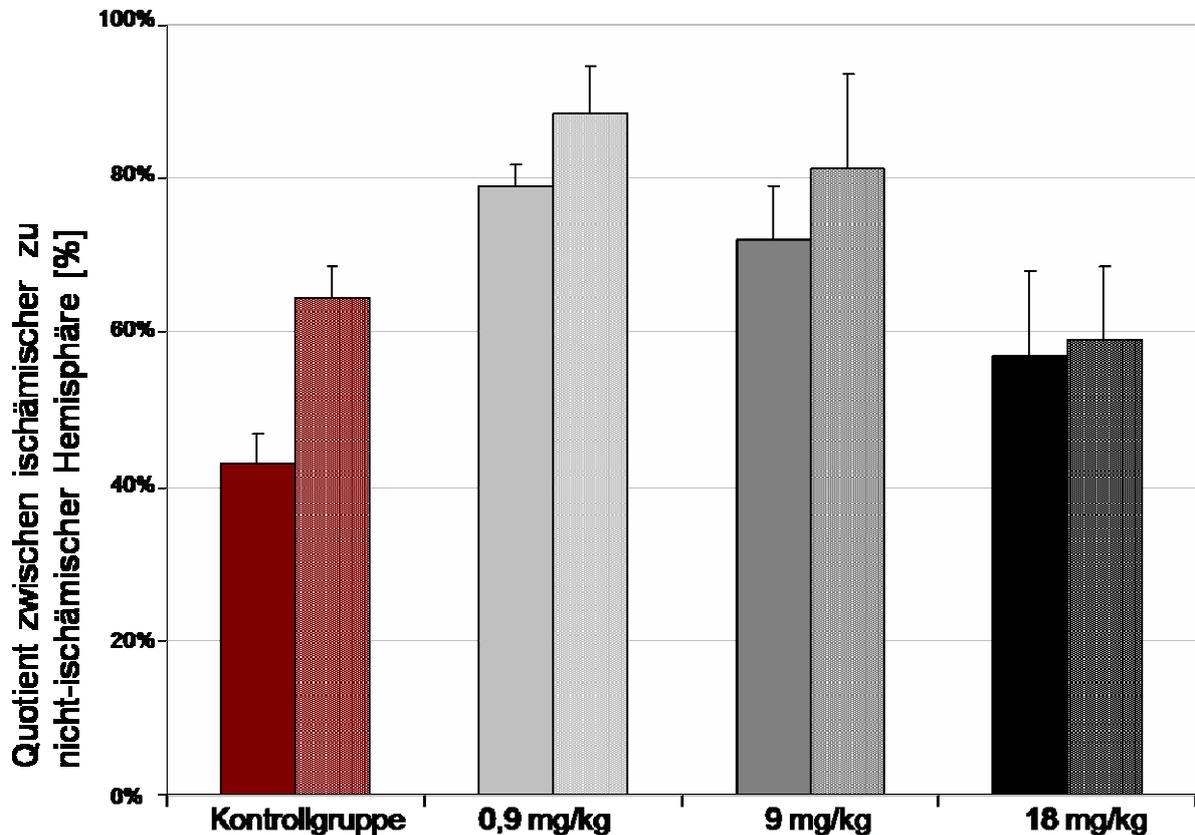


Abbildung 17: Gehalt an Kollagen IV in der ischämischen Seite in Relation zur kontralateralen Seite als Funktion der rt-PA Dosis für Basalganglien und Kortex, angegeben als Mittelwert \pm SEM (jeweils $n = 6$). * $p < 0,05$ (t-Test versus Kontrollgruppe); n.s. = nicht signifikant (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. D. Burggraf, Abteilung für Neurologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München; Burggraf et al., 2003).

Der Gehalt an Kollagen IV in der nicht-ischämischen Seite aller vier Versuchsgruppen wurde anhand der ermittelten OD-Werte der gescannten Western Blots miteinander verglichen. Hierbei ergab sich weder für den Bereich

der Basalganglien noch für den Kortex in den nicht betroffenen Kontroll-Hemisphären ein signifikanter Unterschied in der ANOVA bzw. im t-Test (ANOVA, $p > 0,05$; t-Test, $p > 0,05$). Die OD-Werte im Bereich der Basalganglien und des Kortex wurden in Abhängigkeit der applizierten rt-PA Dosis in Abbildung 18 dargestellt.

Kollagen Typ IV Western Blot

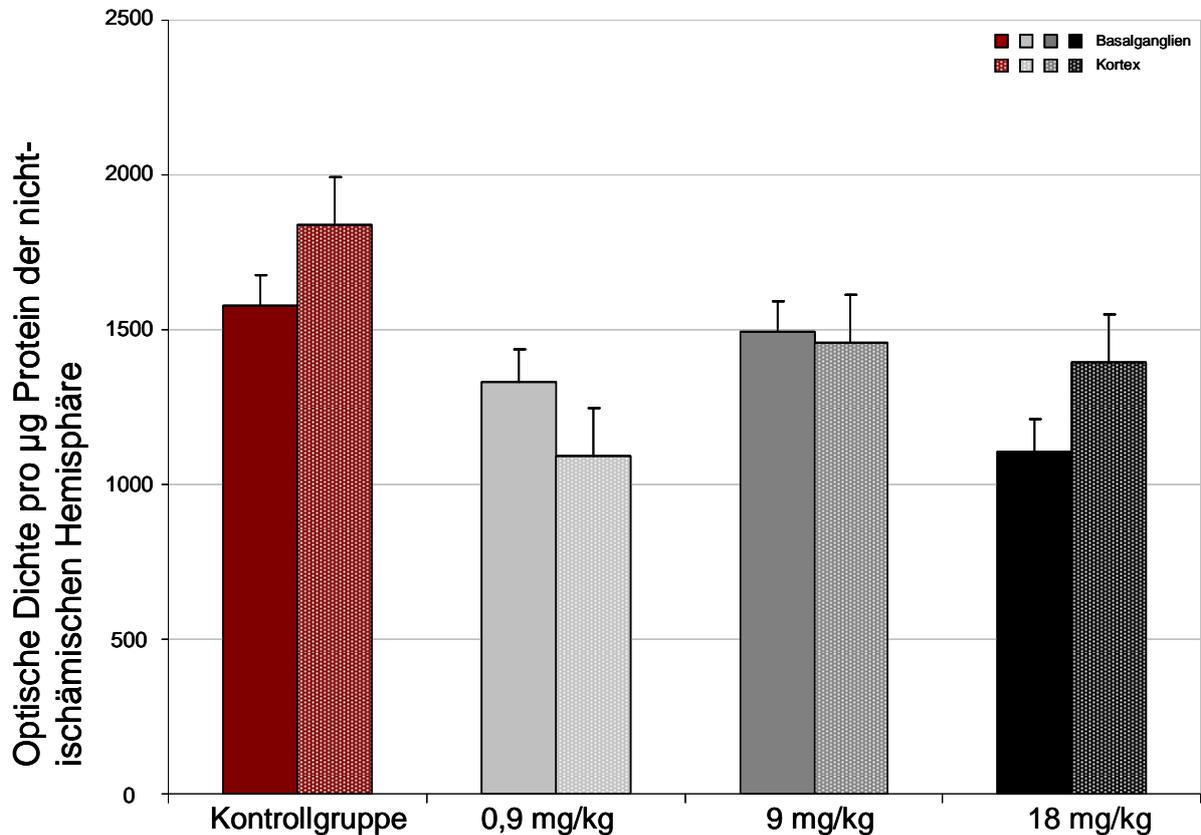


Abbildung 18: Standardisierte OD-Werte (Mittelwert \pm SEM) der Western Blot-Analyse im Bereich der Basalganglien und des Kortex der infarktfreien Hemisphäre für die vier Gruppen ($n = 6$). Die ANOVA Varianzanalyse der Mittelwerte war weder für die Basalganglien noch für den Kortex signifikant ($p < 0,05$). Auch der t-Test des jeweiligen Mittelwerts gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe zeigte keine Signifikanz ($p > 0,05$) (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. D. Burggraf, Abteilung Neurologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München; Burggraf et al., 2003).

4. Diskussion

4.1. Hauptergebnisse

Aus den Daten von Immunhistochemie und Proteinanalyse unserer Arbeit mit vier Studiengruppen zu je sechs Tieren (Wistar Ratten), lassen sich zwei Hauptresultate ableiten.

Im Anschluss an die im Tierversuch mit dem Fadenokklusionsmodell erzeugte 3-stündige Ischämie und die darauf folgende 24-stündige Reperfusion konnte im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen bzw. der Kontrollgruppe, nach der intravenösen Gabe von rt-PA bei einer Dosis von 0,9 mg/kg Körpergewicht im Bereich des Kortex eine signifikante Reduktion des Kollagen IV-Verlustes in der jeweils ischämischen Hemisphäre verzeichnet werden. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei Kollagen IV um einen der Hauptbestandteile der mikrovaskulären Basalmembran handelt, kann somit ein schützender Effekt durch die Gabe von niedrig dosiertem rt-PA auf die Basalmembran bzw. die Mikrogefäße im Rahmen einer zerebralen Ischämie angenommen werden.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist die signifikante Verringerung der Infarktgröße nach Gabe von 0,9 und 9 mg rt-PA/kg Körpergewicht.

4.2. Der Einfluss von rt-PA auf die Basalmembran

In vorausgegangenen Studien an Ratten und Pavianen konnte nach experimentell induzierter, fokaler zerebraler Ischämie ein Abbau von elementaren Bestandteilen der mikrovaskulären Basalmembran wie Kollagen IV und Laminin und damit ein Verlust der mikrovaskulären Integrität beobachtet werden ⁽²⁶⁾ ⁽³⁰⁾. Darüber hinaus hatten sich infolge der Basalmembranzerstörung petechiale Blutungen gezeigt ⁽²⁹⁾. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die

Basalmembran als Teil der extrazellulären Matrix neben der Strukturhaltung auch eine Filterfunktion für Proteine und zelluläre Bestandteile hat ⁽⁵⁸⁾. Sie bildet somit zusammen mit Astrozyten, Endothelzellen und den zugehörigen „tight junctions“ die Blut-Hirn-Schranke ^{(4) (64)}. Die Hauptaufgabe der Endothelzellen in dieser Barriere liegt in der Kontrolle des Transports von Flüssigkeiten und löslichen Substanzen ^{(12) (71)}. Infolge einer Ischämie wird diese Barriere zerstört, so dass die Entstehung eines Ödems möglich wird ⁽³⁾. Unter diesen Umständen verbleibt die Basalmembran als einzige Barriere, um den Anstieg von Plasma und das Eindringen von zellulären Blutbestandteilen in das Hirnparenchym zu verhindern. Im Falle einer Schädigung der Basalmembran kommt es zum Verlust der mikrovaskulären Integrität und somit zum Grundstein für die Entstehung zerebraler Blutungen ^{(27) (29)}.

Nach einer zerebralen Ischämie wird das endogene Plasminogen-Plasmin-System aktiviert ⁽⁶⁶⁾, welches für die spontane Rekanalisation wichtig ist. Das Risiko eines unbehandelten Patienten nach einem Schlaganfall eine intrazerebrale Blutung zu erleiden liegt bei 0,6 %. Durch die Gabe von rt-PA erhöht sich dieses Risiko auf 6,4 % ⁽⁸⁵⁾. In Anbetracht dieses signifikant erhöhten Blutungsrisikos nach der Verabreichung von rt-PA nach einem akuten ischämischen Schlaganfall ist es naheliegend von einem konkreten Einfluss durch das Lysetherapeutikum auszugehen. Die Schädigung des mikrovaskulären Systems spielt dabei vermutlich eine erhebliche Rolle. Verschiedene proteolytische Systeme ^{(45) (77)}, unter anderem das Plasminogen-Plasmin-System und die Matrixmetalloproteinasen (MMP) ^{(18) (31) (41)} sind für den Schaden an der Basalmembran verantwortlich ^{(15) (16) (32) (66)}. Das genaue Ausmaß und die exakten Mechanismen des Einflusses der Plasminogenaktivatoren auf die mikrovaskuläre Integrität sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Beschrieben wurde bereits die Tatsache, dass rt-PA endogenes Plasminogen zu der Serinprotease Plasmin spaltet. Dies hat neben dem gewünschten Effekt der direkten oder indirekten Thrombolyse zusätzliche negative Folgen, wie zum Beispiel die Aktivierung der MMP's und

diverser anderer proteolytischer Enzyme, welche wiederum verschiedene Komponenten der Basalmembran angreifen können ^{(56) (79) (89)}.

Die Tiere, denen in dieser Studie 0,9 mg rt-PA/kg Körpergewicht verabreicht wurde, also die Dosis, die aktuell für eine intravenöse Thrombolyse mit rt-PA beim Menschen nach akutem ischämischen Schlaganfall verwandt wird, zeigte einen geringeren Verlust der Mikrogefäßanzahl im Bereich des Kortex als die anderen Gruppen. In der Western Blot-Analyse für Kollagen IV konnte derselbe Effekt zusätzlich auch bei den Tieren, die 9 mg rt-PA/kg Körpergewicht erhalten hatten, beobachtet werden.

Basierend auf den hier bereits dargelegten pathophysiologischen Mechanismen gibt es für dieses Ergebnis mehrere Erklärungsansätze. Das endogene Plasminogen-Plasmin-System ist unter anderem in den Endothelzellen des mikrovaskulären Systems lokalisiert. Dort wirkt es der Bildung von wandständigen Thromben entgegen und ist somit Teil des fibrinolytischen Systems ^{(49) (51)}. Daraus lässt sich schließen, dass das Endothel an der Regulation der lokalen Homöostase eine aktive Rolle spielt ⁽⁴²⁾. Im Rahmen einer fokalen zerebralen Ischämie kommt es bereits zu einer endogenen Aktivierung von Plasminogen ⁽⁶⁶⁾. Durch die exogene Verabreichung von weiteren Plasminogenaktivatoren wird vermutlich nicht nur die Wirkung auf die Fibrinolyse, sondern ebenso die zerstörende Wirkung auf die Mikrogefäße und damit in der Folge auch auf die neuronalen Zellen verstärkt, die zum Beispiel durch Ödembildung oder entstehende Blutungen weiter geschädigt werden. Das Ergebnis, dass es nach exogen zugeführtem rt-PA in niedrigen Dosen im Vergleich zu höheren Dosen zu einer geringeren Anzahl von zerstörten Mikrogefäßen kommt ^{(6) (20)}, kann einer geringeren zusätzlichen Aktivierung von proteolytischen Enzymen, wie zum Beispiel den Matrixmetalloproteinasen, zugeschrieben werden ^{(47) (65)}. Nicht nur im Vergleich mit den Tieren, die 9 mg bzw. 18 mg rt-PA/kg Körpergewicht erhalten hatten, sondern auch im Vergleich mit der Kontrollgruppe, die kein rt-PA erhalten hatte, fiel in unserer Studie der

mit Hilfe der Immunhistochemie bestimmte mikrovaskuläre Verlust in der Versuchsgruppe mit der niedrigsten Dosis von 0,9 mg rt-PA/kg Körpergewicht geringer aus. Dies spricht zusätzlich für einen protektiven Effekt durch niedrig dosiertes rt-PA auf das mikrovaskuläre System ⁽⁶⁾ ⁽²⁰⁾. In der Proteinbestimmung für Kollagen IV mittels Western Blot zeigte sich dieses Ergebnis auch in der Gruppe, die 9 mg rt-PA /kg Körpergewicht erhalten hatte, so dass der protektive Effekt auch nach der Gabe mittlerer rt-PA Dosen vermutet werden kann.

Pathophysiologisch könnte als Erklärung für den geringeren Gefäßverlust, insbesondere gegenüber unbehandelten Tieren, die erwünschte positive Wirkung von rt-PA auf die Regulationsmechanismen zu Erhaltung der Homöostase verantwortlich sein. Durch die Verstärkung und Beschleunigung der Fibrinolyse kommt es zu einer Verbesserung des Blutflusses und konsekutiv zu einer Reduktion der Bildung von Mikrothromben nach erfolgter Ischämie ⁽⁵⁰⁾ ⁽⁸⁴⁾. Der geringere mikrovaskuläre Schaden wäre somit durch die verbesserte Mikrozirkulation mit Reduktion der distalen Thrombusbildung bedingt.

Diesem erwünschten Effekt steht die Proteasen vermittelte Zerstörung der Basalmembran gegenüber, die sich in unserer Studie vor allem nach der Gabe von hochdosiertem rt-PA, entsprechend 18 mg rt-PA/kg Körpergewicht, bemerkbar gemacht hat. Unter Einbeziehung der Theorie des verminderten Gefäßschadens nach der Gabe von niedrigen und mittleren rt-PA-Dosen, ist nach der Gabe von hochdosiertem rt-PA wahrscheinlich die vermehrte Aktivierung proteolytischer Systeme für den erhöhten Kollagen - bzw. Gefäßverlust verantwortlich.

Bei der klinischen Anwendung von rt-PA ist, neben dem erwünschten Effekt der Thrombolyse, vor allem das Auftreten intrazerebraler Blutungen als Nebenwirkung von Bedeutung ⁽⁸⁵⁾. Die hier vorgelegten Versuchsergebnisse werfen die Frage auf, inwieweit das zerebrale Blutungsrisiko mit der applizierten rt-PA Dosis bzw. mit dem entstandenen mikrovaskulären Schaden korreliert.

Diese Fragestellung wurde in einer weiterführenden Versuchsreihe in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Die Studie von Burggraf et al. ⁽⁵⁾ untersuchte die

Freisetzung von Blutkomponenten nach der Gabe unterschiedlicher Dosen von rt-PA (0,9 mg, 9 mg und 18 mg rt-PA/kg Körpergewicht) im gleichen Tiermodell. Es zeigte sich hier eine signifikante, dosisabhängige Extravasation von Blutbestandteilen. Je höher die applizierte rt-PA Dosis war, desto mehr Blut wurde im Gehirngewebe nachgewiesen. In Zusammenschau dieser Daten mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit kann ein linearer signifikanter Zusammenhang zwischen Schädigung der Basalmembran und der Blutung gezeigt werden ⁽⁵⁾.

4.3. Der Einfluss von rt-PA auf das Infarktvolumen

Bei den Tieren, die 0,9 mg bzw. 9 mg rt-PA/kg Körpergewicht erhalten hatten, fand sich im Mittel eine deutliche Abnahme des Infarktvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Gruppe, die rt-PA in der hohen Dosis von 18 mg/kg Körpergewicht erhalten hatte. Je kleiner das Infarktareal, umso kleiner ist der neuronale Zellschaden bzw. die Menge des zerstörten Hirngewebes. Diese Tatsache lässt in Anbetracht unserer gewonnenen Resultate neben dem oben beschriebenen protektiven Effekt auf die Mikrogefäße auch auf einen neuroprotektiven Effekt von rt-PA in niedrigen und mittleren Dosen schließen. Unter anderem könnte genau dieser schützende Effekt auf die Mikrogefäße für die Reduktion des Infarktareals mitverantwortlich sein.

Vorausgegangene Arbeiten erbrachten bezüglich des Einflusses von rt-PA bzw. tPA auf das Ausmaß des Infarktes widersprüchliche Ergebnisse. So fanden Klein et al. ⁽⁴³⁾ in der Infarktgröße bei spontan hypertensiven männlichen Wistar Ratten sowohl bei global als auch bei fokal induzierter zerebraler Ischämie keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Infarktgröße und der verabreichten Dosis von rt-PA.

Im Gegensatz dazu berichteten Kilic et al. ⁽³⁹⁾ ⁽⁴⁰⁾ von einer signifikanten Reduktion des Infarktvolumens durch die Gabe von rt-PA nach fokaler

zerebraler Ischämie bei Mäusen. Yang et al. ⁽⁹³⁾ beobachteten einen mäßigen neuroprotektiven Effekt nach der Verabreichung von rt-PA in einem thrombembolischen Schlaganfallmodell bei Ratten. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu verschiedenen Studien, in denen nach experimenteller Ischämie und Gabe von rekombinantem t-PA eine zusätzliche Schädigung des Hirngewebes beschrieben wurde ^{(8) (90)}. Neben seiner Funktion in der Aktivierung der Fibrinolyse und der daraus folgenden Verbesserung des Blutflusses, ist tPA auch für viele andere Prozesse von Bedeutung, wie zum Beispiel bei der Zellmigration ^{(60) (76)}, der Interaktion von Schwannzellen ⁽⁹⁾ oder der Differenzierung von Astrozyten ^{(36) (67)}. Innerhalb des Hirngewebes ist tPA unter anderem in neuronalen Zellen und Mikrogliazellen lokalisiert ⁽⁸⁷⁾⁽⁸⁸⁾. In mehreren Arbeiten wurde bereits untersucht, ob tPA den neuronalen Schaden unter ischämischen Bedingungen verstärkt. Nagai et al. ⁽⁶¹⁾ setzten Wildtyp- und tPA-knock-out-Zellen durch Sauerstoff- und Glucosemangel unter ischämie-ähnliche Bedingungen. Dabei fand sich in den tPA exprimierenden Zellen im Vergleich zu den tPA-knock-outs eine zweifach höhere Zelltodrate. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Arbeit von Wang et al. ⁽⁹⁰⁾, die in einem Mäusemodell mit Verschluss der MCA und anschließender Reperfusion bei Wildtypmäusen mit intakter tPA Expression von einem 50 % größeren Infarkt volumen berichtete als in tPA-knock-out-Tieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass tPA auch auf die Lebensfähigkeit von neuronalen Zellen einen entscheidenden Einfluss hat. Der neuronale Schaden nach Ischämie wird wesentlich durch Exzitotoxine, wie zum Beispiel Glutamat, vermittelt ^{(54) (57)}. Weitere Arbeiten zeigten, dass rt-PA diesen exzitotoxischen Effekt noch weiter verstärkt ^{(38) (62)}. Dieser neurotoxische Effekt scheint unabhängig von der positiven thrombolytischen Aktivität von tPA zu sein ⁽⁹⁰⁾. Es wurden bereits Versuche unternommen diesem Effekt durch Inhibierung der Glutamatwirkung entgegenzuwirken, wobei eine geringere Infarktgröße sowie ein vermindertes neurologisches Defizit dokumentiert werden konnte ⁽⁹³⁾.

4.4. Schlussfolgerungen

Diese Arbeit zeigt nun nach Auswertung der immunhistochemischen Versuche sowie der Western Blots mit Hilfe zweier unabhängiger Methoden bei einer Dosis von 0,9 mg bzw. in der Proteinanalyse auch bei 9 mg rt-PA/kg Körpergewicht, eine positive Wirkung auf die Veränderungen der Basalmembran nach zerebraler Ischämie und Reperfusion. Zusätzlich konnte in diesen beiden Versuchsgruppen im Vergleich zu den anderen Gruppen eine geringere Infarktgröße nachgewiesen werden. Das zur Lysetherapie bei akuter zerebraler Ischämie eingesetzte rt-PA scheint somit neben dem thrombolytischen Effekt außerdem eine schützende Wirkung auf das Mikrogefäßsystem sowie eine neuroprotektive Wirkung zu besitzen. Als Mechanismus für diesen positiven Effekt auf Mikrogefäße und Infarktausdehnung lassen sich mehrere Erklärungsansätze finden. Eine Ischämie führt im Allgemeinen zu Zerstörung und Verlust des betroffenen Gewebes, so dass bei einer geringeren Infarktgröße entsprechend ein geringerer Gewebeschaden anzunehmen ist. Der deutlich verminderte Kollagen IV-Verlust nach der Gabe von 0,9 mg bzw. 9 mg rt-PA/kg Körpergewicht spiegelt möglicherweise eine verminderte Schädigung der Basalmembran wider, die einerseits einer vermehrten Extravasation in umgebendes Gewebe entgegenwirkt und andererseits einen suffizienten Blutfluss fördert. Durch die Erhaltung eines ausreichenden Blutflusses wird schließlich die Fortführung bzw. Wiederherstellung des zellulären Metabolismus gewährleistet. Es resultiert somit als Folge der verbesserten Mikrozirkulation ein geringerer Gewebeschaden, da hiermit eine ausreichende Reperfusion ohne die ungünstigen Effekte von Ödem und Blutung ermöglicht wird.

Im Hinblick auf die klinische Relevanz unserer Untersuchungsergebnisse muss jedoch als wichtiger Punkt die unterschiedliche Wirkung von rt-PA in Ratten und Menschen ⁽³⁸⁾ bedacht werden. Ein protektiver Effekt von rt-PA auf das

mikrovaskuläre System wurde bei den mit 0,9 mg rt-PA/kg Körpergewicht behandelten Tieren bei beiden Methoden beobachtet. Diese Dosis würde aber beim Menschen lediglich 0,09 mg rt-PA/kg Körpergewicht entsprechen, also einem Zehntel der aktuell im klinischen Alltag verwandten Dosis zur Lysetherapie nach akuten Schlaganfall ⁽¹⁰⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾⁽⁸³⁾.

Der Beobachtung, dass rt-PA in niedriger Dosierung über einen protektiven Effekt auf Mikrogefäße verfügt, steht die Frage gegenüber, ob bei geringeren rt-PA Dosen auch eine suffiziente Thrombolyse induziert werden kann. Das auch geringere Dosen von rt-PA klinisch wirksam sein können, deuten japanische Daten an. Yoneda et al. konnten mit einer Dosis von 0,6 mg rt-PA/kg Körpergewicht eine Verbesserung des klinischen Verlaufs nach akutem Schlaganfall erreichen ⁽⁹⁴⁾. Immerhin nur zwei Drittel der sonst verwendeten Dosis. Weitere klinische und experimentelle Studien werden zur Beurteilung der optimalen rt-PA Dosierung beim ischämischen Hirninfarkt benötigt.

4.5. Methodische und konzeptionelle Einschränkungen der Arbeit

Die Verdünnung der berechneten Menge an rt-PA für jedes Tier in Abhängigkeit von Körpergewicht und Versuchsgruppenzugehörigkeit auf jeweils ein 1ml bringt eine unterschiedlich hohe Konzentration an rt-PA in der applizierten Lösung für die einzelnen Versuchstiere mit sich. Eine Verdünnung zu einer Lösung mit einer äquivalenten Konzentration an rt-PA für jedes Tier ließe sich jedoch in Anbetracht der damit zum Teil im Verhältnis zum geringen Blutvolumen der Versuchstiere entstehenden erheblichen Volumina nicht umsetzen. In Anbetracht der zentralvenösen und langsamen Verabreichung der Substanz über insgesamt 1 Stunde sollte eine Beeinträchtigung der Wirkung auf den Organismus vernachlässigbar sein.

Bei der Bewertung der Versuchsergebnisse müssen außerdem folgende Punkte bedacht werden. Aus jeder der vier experimentellen Versuchsgruppen wurden

nur sechs Tiere eingeschlossen, insgesamt stand also ein Untersuchungsmaterial von 24 Rattenhirnen zur Verfügung. Vor einer Übertragung in den klinischen Alltag ist eine Bestätigung der erhobenen Resultate in nachfolgenden Studien mit deutlich höherer Tieranzahl erforderlich.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die bereits oben ausgeführte unterschiedliche Wirkung von rt-PA in Ratten und Menschen ⁽³⁸⁾, welche bei Übertragung der Ergebnisse von Tier auf Mensch bedacht werden muss.

In der vorliegenden Arbeit wurden auftretende Blutungen und Ödembildung nicht dokumentiert. Ein erster Schritt zur weiteren Untersuchung dieser Problematik erfolgte bereits durch Burggraf et al. ⁽⁵⁾ mit der Bestimmung der Extravasation von Blutkomponenten nach der Gabe unterschiedlicher Dosen von rt-PA. Die Zusammenhänge zwischen einem Schutz der Basalmembran durch niedrig dosiertes rt-PA sowie allgemein die Korrelation von rt-PA Dosis, Basalmembranschaden und Blutungen müssen jedoch noch weiter untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Der frühe Einsatz von rt-PA ist eine nachgewiesene Therapie im Rahmen der Behandlung eines akuten ischämischen Schlaganfalls. Als häufigste und gefürchtete Komplikation kommt es bei dieser Therapieform zum Auftreten von intrazerebralen Blutungen. Experimentelle Versuche haben gezeigt, dass Hämorrhagien nach einem primären ischämischen Schlaganfall mit dem Verlust der mikrovaskulären Integrität bzw. dem Abbau von Komponenten der Basalmembran verbunden sind.

Ein Ziel dieser Studie war es, die mikrovaskulären Veränderungen nach experimentell erzeugter fokaler zerebraler Ischämie im Zusammenhang mit der Verabreichung unterschiedlicher Dosen von rt-PA zu untersuchen. In einem weiteren Schritt betrachteten wir die Infarktgröße in Abhängigkeit von der rt-PA-Dosierung.

Mit einem Fadenokklusionsmodell wurde bei Ratten für 3 Stunden eine fokale zerebrale Ischämie im Gebiet der linken Arteria cerebri media erzeugt. Anschließend folgte durch Zurückziehen des Fadens eine 24-stündige Reperfusion. Untersucht wurden insgesamt vier Gruppen zu jeweils sechs Tieren. Einer Gruppe wurden 0,9 mg rt-PA /kg Körpergewicht, der zweiten 9 mg rt-PA/kg Körpergewicht und einer dritten Gruppe 18 mg rt-PA/kg Körpergewicht appliziert. Eine vierte Gruppe diente als Kontrollgruppe und erhielt statt rt-PA eine isotone Kochsalzlösung. Immunhistochemisch wurde durch Anfärben von Kollagen Typ IV die mikrovaskuläre Basalmembran sichtbar gemacht. Die Anzahl der angefärbten Gefäße wurde mit Hilfe eines morphometrischen Videosystems berechnet. Die Gefäßanzahl und die Gefäßdichte wurden sowohl in den Basalganglien als auch im Kortex der ischämischen Seite gemessen und mit dem entsprechenden Areal der nicht-ischämischen Seite verglichen. Die Abnahme der Mikrogefäße war in der

Gruppe mit der niedrigen rt-PA Dosis, entsprechend 0,9 mg rt-PA/kg Körpergewicht, signifikant geringer als in den anderen Gruppen. Derselbe Effekt wurde bei der Gefäßdichte beobachtet.

In der Hochdosisgruppe mit 18 mg rt-PA/kg Körpergewicht war im Vergleich zu den anderen rt-PA-Gruppen sowie zu der Kontrollgruppe sowohl der Gefäßverlust als auch die Abnahme der Gefäßdichte am größten.

Die Infarktgröße wurde mit einem MAP2-Antikörper immunhistochemisch dargestellt und mit Hilfe einer 3-D Rekonstruktion berechnet. Es zeigte sich für die Gruppen mit 0,9 und 9 mg rt-PA eine signifikante Verminderung des Infarktolumens in Relation zur Kontrollgruppe. Die mittlere Infarktgröße der Hochdosisgruppe lag über der, der beiden anderen rt-PA-Gruppen und unter derjenigen der Kontrollgruppe. Die Unterschiede waren hier nicht signifikant.

Als weitere Methode erfolgte eine Quantifizierung des Kollagen IV Gehaltes mittels Western Blot, wobei der Gehalt an Kollagen IV in beiden Hemisphären sowohl in den Basalganglien als auch im Kortex bestimmt wurde. Im Anschluss erfolgte erneut ein Vergleich zwischen der ischämischen und der nicht-ischämischen Hemisphäre. Hier zeigte sich, entsprechend den Ergebnissen aus der Immunhistochemie, eine geringere Abnahme des Kollagengehaltes in der 0,9 mg rt-PA-Gruppe. Zusätzlich fand sich auch eine geringere Abnahme des Kollagengehaltes in der 9 mg rt-PA-Gruppe. Die Hochdosisgruppe zeigte hier mit einem größeren Kollagenverlust einen signifikanten Unterschied zu den anderen beiden rt-PA-Gruppen, jedoch nicht zur Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass extern zugeführtes rt-PA nach fokaler zerebraler Ischämie bei Ratten in niedrigen bzw. mittleren Dosen einen günstigen Effekt auf die mikrovaskuläre Integrität ausübt. Darüber hinaus fanden wir bei niedrigen und mittleren Dosen von rt-PA eine Abnahme des neuronalen Schadens. Der Hauptgrund für diesen schützenden Effekt auf die Mikrogefäße mag, neben der aktiven Thrombolyse, in der nach diesen Dosen schwächeren Aktivierung anderer proteolytischer Enzyme begründet sein. Die

geringere Zerstörung der Mikrogefäße im Vergleich zur Kontrollgruppe scheint außerdem an einer durch die thrombolytische Wirkung des rt-PA verbesserten Mikrozirkulation zu liegen. Der verbesserte Blutfluss mit Gewährleistung des zellulären Metabolismus kann als Ursache für die Verringerung der Infarktgröße angenommen werden.

Bei der Bewertung dieser Studienergebnisse muss beachtet werden, dass humanes rt-PA in der Aktivierung von Ratten-Plasminogen 10-fach weniger effizient wirkt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse nicht mit dem Auftreten intrazerebraler Blutungen korreliert. Obwohl in unserer Arbeitsgruppe bereits hierzu erste Versuchsreihen durchgeführt wurden, werden zur Bewertung einer klinischen Relevanz noch weiterführende Experimente zu den Wirkmechanismen und Effekten exogener Plasminogenaktivatoren nötig sein.

6. Literaturverzeichnis

1. **Aronowski J**, Strong R, Grotta JC. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997 Oct;17(10):1048-56.
2. **Berlit P**, Popescu O, Klötzsch C, Diehl RR, Berg-Dammer E. Treatment of acute stroke on the stroke unit. Initial experiences with an acute stroke unit in Germany. *Nervenarzt.* 1997 Feb;68(2):122-8.
3. **Betz AL**, Ennis SR, Schielke GP. Blood-brain barrier sodium transport limits development of brain edema during partial ischemia in gerbils. *Stroke.* 1989 Sep;20(9):1253-9.
4. **Bradbury MW**. The blood-brain barrier. Transport across the cerebral endothelium. *Circ Res.* 1985 Aug;57(2):213-22.
5. **Burggraf D**, Martens HK, Dichgans M, Hamann GF. Rt-PA causes a dose-dependent increase in the extravasation of cellular and non-cellular blood elements after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2007 Aug 20;1164:55-62.
6. **Burggraf D**, Martens HK, Jäger G, Hamann GF. Recombinant human tissue plasminogen activator protects the basal lamina in experimental focal cerebral ischemia. *Thromb Haemost.* 2003 Jun;89(6):1072-80.
7. **Burggraf D**, Lottspeich F. The further construction of the two-dimensional database of common human proteins. *Electrophoresis.* 1995 May;16(5):831-40.
8. **Chen ZL**, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell.* 1997 Dec 26;91(7):917-25.
9. **Clark MB**, Zeheb R, White TK, Bunge RP. Schwann cell plasminogen activator is regulated by neurons. *Glia.* 1991;4(5):514-28.
10. **Clark WM**, Wissmann S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S. Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a

randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Nonintervetional Therapy in Ischemic Stroke. JAMA. 1999 Dec 1;282(21):2019-26.

11. Del Zoppo GJ. Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. Cerebrovasc Brain Metab Rev. (United States), Spring 1994;6(1): 47-96.

12. Del Zoppo GJ, Hallenbeck JM. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. Thromb Res. 2000 May 1;98(3):73-81.

13. Dietrich WD. Neurobiology of stroke. Int Rev Neurobiol. 1998;42:55-101.

14. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA, Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci (England) 1999 Sep;22(9):391-7.

15. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. Circ Res. 1995 Nov; 77(5):863-8.

16. Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL, del Zoppo GJ. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. Stroke. 2004 Apr;35(4):998-1004.

17. Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2001 Dec;21(12):1393-400.

18. Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. J Cereb Blood Flow Metab. 1999 Sep;19(9):1020-8.

19. Goldstein GW, Betz AL. The blood-brain barrier. Sci Am. 1986 Sep;255(3): 74-83.

20. Grobholz K, Burggraf D, Martens KH, Wunderlich N, Pichler M, Hamann GF. Recombinant tissue plasminogen activator attenuates basal lamina antigen loss after experimental focal cerebral ischemia. Neurol Res. 2005 Mar;27(2): 212-7.

- 21. Gulba DC, Praus M, Dechend R, Moll S, Dietz R.** Thrombolyse - neue Thrombolytika, neue Begleittherapie: Update 1999. *Journal für Kardiologie.* 1999; 6(3):142-53.
- 22. Gürsoy-Ozdemir Y, Can A, Dalkara T.** Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2004 Jun;35(6):1449-53.
- 23. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Höxter G, Mahagne MH, Hennerici M.** Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA.* 1995 Oct 4;274 (13):1017-25.
- 24. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donnan G, Schneider D, Diez-Tejedor E, Trouillas P.** Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet.* 1998 Oct 17;352 (9136): 1245-51.
- 25. Hamann GF, Siebler M, von Scheidt W, Schlaganfall: Klinik-Diagnostik-Therapie; Interdisziplinäres Handbuch, Landsberg/Lech: ecomed, 2002; 3.1.** Ischämischer Hirninfarkt - Endres M, Dirnagl U;91-112.
- 26. Hamann GF, Liebetrau M, Martens HK, Burggraf D, Kloss CUA, Bültemeier G, Wunderlich N, Jäger G, Pfefferkorn T.** Microvascular basal lamina injury after experimental focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 May;22(5):526-33.
- 27. Hamann GF, del Zoppo GJ, von Kummer R.** Hemorrhagic transformation of cerebral infarction-possible mechanisms. *Thromb Haemost.* 1999 Sept;82 Suppl 1:92-4.
- 28. Hamann GF, del Zoppo GJ, von Kummer R.** Mechanisms for the development of intracranial hemorrhage. Possible implications for thrombolysis

in cerebral infarct. *Nervenarzt*. 1999 Dec;70(12):1116-20.

29. Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996 Nov;16(6):1373-8.

30. Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1995 Nov;26(11):2120-6.

31. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999 Sep; 19(9):624-33.

32. Hosomi N, Lucero J, Heo JH, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Rapid differential endogenous plasminogen activator expression after acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2001 Jun;32(6):1341-8.

33. Iadecola C. Overview: Mechanisms of cerebral ischemic damage. In: W. Walz, Editor. *Cerebral ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology*. Humana press, Totowa, NJ (1999);3-32.

34. Iijima T, Shimase C, Sawa H, Sankawa H. Spreading depression induces depletion of MAP2 in area CA3 of the hippocampus in a rat unilateral carotid occlusion model. *J Neurotrauma (United States)*. 1998 Apr;15(4):277-84.

35. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960 Jul;70:68-78.

36. Kalderon N, Ahonen K, Fedoroff S. Developmental transition in plasticity properties of differentiating astrocytes: age-related biochemical profile of plasminogen activators in astroglial cultures. *Glia*. 1990;3(5):413-26.

37. Karmazyn M. The 1990 Merck Frosst Award. Ischemic and reperfusion injury in the heart: Cellular mechanisms and pharmacological intervention. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991 Jun;69(6):719-30.

- 38. Karges HE, Funk KA, Ronneberger H.** Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. *Arzneimittelforschung*. 1994 Jun;44(6):793-7.
- 39. Kilic E, Bähr Mathias, Hermann DM.** Effects of recombinant tissue plasminogen activator after intraluminal thread occlusion in mice: role of hemodynamic alterations. *Stroke*. 2001 Nov;32(11):2641-7.
- 40. Kilic E, Hermann DM, Hossmann KA.** Recombinant tissue plasminogen activator reduces infarct size after reversible thread occlusion of middle cerebral artery in mice. *Neuroreport*. 1999 Jan 18;10(1):107-11.
- 41. Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM, Chan PH.** Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption. *J Neurosci*. 2003 Sep 24;23(25):8733-42.
- 42. Kittaka M, Wang L, Sun N, Schreiber SS, Seeds NW, Fisher M, Zlokovic BV.** Brain capillary tissue plasminogen activator in a diabetes stroke model. *Stroke*. 1996 Apr;27(4):712-9.
- 43. Klein GM, Li H, Sun P, Buchan AM.** Tissue plasminogen activator does not increase neuronal damage in rat models of global and focal ischemia. *Neurology* 1999 Apr 22;52(7):1381-4.
- 44. Kloss CUA, Thomassen N, Fesl G, Martens KH, Yousri TA, Hamann GF.** Tissue-saving infarct volumetry using histochemistry validated by MRI in rat focal ischemia. *Neurol Res*. 2002 Oct;24(7):713-8.
- 45. Kohda Y, Yamashima T, Sakuda K, Yamashita j, Ueno T, Kominami E, Yoshioka t.** Dynamic changes of cathepsins B and L expression in the monkey hippocampus after transient ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Nov 12;228(2):616-22.
- 46. Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- 47. Lapchak PA, Araujo DM.** Reducing bleeding complications after

thrombolytic therapy for stroke: clinical potential of metalloproteinase inhibitors and spin trap agents. *CNS Drugs*. 2001;15(11):819-29.

48. Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke*. 2000 Dec;31(12):3034-40.

49. Lijnen HR, Collen D. Endothelium in hemostasis and thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis*. 1997 Jan-Feb;39(4):343-50.

50. Lijnen HR, Marafino BJ, Collen D. In vitro fibrinolytic activity of recombinant tissue-type plasminogen activator in the plasma of various primate species. *Thromb Haemost*. 1984 Dec 29;52(3):308-10.

51. Lijnen HR, Van Hoef B, Lupu F, Moons L, Carmeliet P, Collen D. Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Jul;18(7):1035-45.

52. Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V, Garbisa S. Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res*. 1981 Nov;41(11 Pt 1):4629-36.

53. Liotta LA, Goldfarb RH, Terranova VP. Cleavage of laminin by thrombin and plasmin: Alpha thrombin selectively cleaves the beta chain of laminin. *Thromb Res*. 1981 Mar;21(6):663-73.

54. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994 Mar 3;330(9):613-22.

55. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989 Jan;20(1):84-91.

56. Mackay AR, Corbit RH, Hartzler JL, Thorgeirsson UP. Basement membrane type IV collagen degradation: evidence for the involvement of a proteolytic cascade independent of metalloproteinases. *Cancer Res*. 1990 Sep 15;50(18):5997-6001.

- 57. Meldrum B, Garthwaite J.** Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1990 Sep;11(9):379-87.
- 58. Ment LR, Stewart WB, Ardito TA, Madri JA.** Germinal matrix microvascular maturation correlates inversely with the risk period for neonatal intraventricular hemorrhage. *Brain Res.* 1995 Jan 14;84(1):142-9.
- 59. Mohr JP, Caplan LR, Melski JW, Goldstein RJ, Duncan GW, Kistler JP, Pessin MS, Bleich HL.** The Harvard Cooperative Stroke Registry: a prospective registry. *Neurology.* 1978 Aug;28(8):754-62.
- 60. Moonen G, Grau-Wagemans MP, Selak I.** Plasminogen activator-plasmin system and neuronal migration. *Nature.* 1982 Aug;298(5876): 753-5.
- 61. Nagai N, Yamamoto S, Tsuboi T, Ihara H, Urano T, Takada Y, Terakawa S, Takada A.** Tissue-type plasminogen activator is involved in the process of neuronal death induced by oxygen-glucose deprivation in culture. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Jun;21(6):631-4.
- 62. Nicole O, Dogagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A.** The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med.* 2001 Jan;7(1):59-64.
- 63. Paxinos G and Watson C, eds.** The rat brain. Academic press, 4th edition; San Diego, London, Boston 1998.
- 64. Peters A., Palay BL, Webster H de F, Editors.** The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells. Oxford University Press, New York USA 1991 (3rd ed.);352-3.
- 65. Pfefferkorn T, Rosenberg GA.** Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke.* 2003 Aug;34(8):2025-30.
- 66. Pfefferkorn T, Staufer B, Liebetrau M, Bültmeier G, Vosko MR, Zimmermann C, Hamann GF.** Plasminogen activation in focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Feb;20(2):337-42.
- 67. Pittman RN, Di Benedetto AJ.** PC12 cells overexpressing tissue plasminogen

activator regenerate neurites to a greater extent and migrate faster than control cells in complex extracellular matrix. *J Neurochem.* 1995 Feb;64(2):566-75.

68. Poeck K, Hacke W, Neurologie, Aachen/Heidelberg: Springer; 11.Auflage 2001;11.4.Pathophysiologie:301-2.

69. Pulsinelli WA, Duffy TE. Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia. *J Neurochem.* 1983May;40(5):1500-3.

70. Rijken DC, Collen D. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J Biol Chem.* 1981 Jul 10;256(13):7035-41.

71. Risau W, Wolburg H. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 1990 May;13(5):174-8.

72. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 May;16(3):360-6.

73. Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Lovelock CE, Redgrave JN, Bull LM, Welch SJ, Cuthbertson FC, Binney LE, Gutnikov SA, Anslow P, Banning AP, Mant D, Mehta Z. Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet.* 2005 Nov 19;366(9499):1773-83.

74. Schellinger PD, Kaste M, Hacke W. An update on thrombolytic therapy for acute stroke. *Curr Opin Neurol.* 2004 Feb;17(1):69-77.

75. Schmidt RF, Thews G, Physiologie des Menschen, Berlin/Heidelberg/New York: Springer, 27.Auflage 1997;V;21.6 Blutstillung und Gerinnung:427-35.

76. Seeds NW, Haffke S, Christensen K, Schoonmaker J. Cerebellar granule cell migration involves proteolysis. *Adv Exp Med Biol.* 1990;265:169-78.

77. Seyfried DM, Veyna R, Han Y, Li K, Tang N, Betts RL, Weinsheimer S, Chopp M, Angali J. A selective cystein protease inhibitor is non-toxic and

cerebroprotective in rats undergoing transient middle cerebral artery ischemia. *Brain Res.* 2001 May 18;901(1-2):94-101.

78. Solis OJ, Roberson GJ, Taveras JM, Mohr JP. Cerebral angiography in acute cerebral infarction. *Rev Interam Radiol.* 1977 Jan;2(1):19-25.

79. Sperti G, van Leeuwen RTJ, Quax PHA, Maseri A, Kluft C. Cultured rat aortic vascular smooth muscle cells digest naturally produced extracellular matrix. Involvement of plasminogen-dependent and plasminogen-independent pathways. *Circ Res.* 1992 Aug;71(2):385-92.

80. Sporer B, Martens KH, Koedel U, Haberl RL. L-arginine-induced regional cerebral blood flow increase is abolished after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997 Oct;17(10):1074-80.

81. Statistisches Bundesamt, Statistisches Jahrbuch 2005 für die Bundesrepublik Deutschland. Wiesbaden:2005.

82. Sundararajan S, Morgenstern LB. Thrombolysis for acute stroke: is it for everyone? *Curr Atheroscler Rep.* 2000 Mar;2(2):97-103.

83. Tanne D, Kasner SE, Demchuk AM, Koren-Morag N, Hanson S, Grond M, Levine SR. Markers of increased risk of intracerebral hemorrhage after intravenous recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute ischemic stroke in clinical practice: the Multicenter rt-PA Stroke Survey. *Circulation.* 2002 Apr 9;105(14):1679-85.

84. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995 Dec 14;333(24):1581-87.

85. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke t-PA Stroke Study Group. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. *Stroke.* 1997 Nov;28(11):2109-18.

86. Trepel M, Neuroanatomie, München/Jena: Urban & Fischer, 2. Auflage 1999;1.3.3. Blut-Hirn-Schranke:8.

87. Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. Excitotoxin-induced

neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature*. 1995 Sep 28;377(6547):340-4.

88. Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci*. 1997 Jan 15;17(2):543-52.

89. Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest*. 1991 Oct;88 (4):1067-72.

90. Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med*. 1998 Feb;4(2):228-31.

91. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci*. 2000 Oct 1;179(S 1-2):1-33.

92. Yamaguchi T, Minematsu K, Hasegawa Y. General care in acute stroke. *Cerebrovasc Dis*. 1997;7 (Suppl 3):12-17.

93. Yang Y, Li Q, Yang T, Hussain M, Shuaib A. Reduced brain infarct volume and improved neurological outcome by inhibition of the NR2B subunit of NMDA receptors by using CP101, 606-27 alone and in combination with rt-PA in a thrombembolic stroke model in rats. *J Neurosurg*. 2003 Feb;98(2):397-403.

94. Yoneda Y, Yamamoto S, Hara Y, Ohta K, Matsushita M, Yamamoto D, Yamashita H, Hosoda K. Post-licensed 1-year experience of systemic thrombolysis with tissue plasminogen activator for ischemic stroke in a Japanese neuro-unit. *Clin Neurol Neurosurg*. 2007 Sep;109(7):567-70.

95. Yurchenco PD, Schittny JC. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J*. 1990 Apr 1;4(6):1577-90.

96. Zamarron C, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by natural and recombinant tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem*. 1984 Feb;259(4):2080-3.

Ausschnitte dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. Burggraf D, Martens HK, Jäger G, Hamann GF. Recombinant human tissue plasminogen activator protects the basal lamina in experimental focal cerebral ischemia. *Thromb Haemost.* 2003 Jun;89(6):1072-80.

2. Grobholz K, Burggraf D, Martens KH, Wunderlich N, Hamann GF. Recombinant tissue plasminogen activator attenuates basal lamina antigen loss after experimental focal cerebral ischemia (Abstract). 28th International Stroke Conference, American Stroke Association, Phoenix, Arizona, USA. *Stroke.* 2003;34(1):306.

3. Grobholz K, Burggraf D, Martens KH, Wunderlich N, Pichler M, Hamann GF. Recombinant tissue plasminogen activator attenuates basal lamina antigen loss after experimental focal cerebral ischemia. *Neurol Res.* 2005 Mar; 27(2):212-7.

8. Lebenslauf

Personalien:

Name: Katharina Grobholz
Geburtsdatum: 19.06.1976
Geburtsort: München
Nationalität: deutsch
Konfession: römisch-katholisch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1982-1986 Grundschule Hans-Adlhoch in Augsburg
1986-1995 Gymnasium A.B. von Stettensches Institut in Augsburg
30.06.1995 Allgemeine Hochschulreife am A.B. von Stettensches Institut
in Augsburg

Studium:

1995 - 1997 Drei Semester Studium der Physik an der Christian-Albrecht-
Universität zu Kiel
04/98-04/04 **Studium der Humanmedizin an der LMU-München**
29.03.2000 Ärztliche Vorprüfung
22.03.2001 Ärztliche Prüfung, erster Abschnitt
21.03.2003 Ärztliche Prüfung, zweiter Abschnitt
15.04.2004 Ärztliche Prüfung, dritter Abschnitt

Stipendien:

- 04/98 - 04/04 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 05/01- 10/02 Promotionsstipendium im Rahmen des DFG
Graduiertenkollegs 688 „Neurotraumatologie und
neuropsychologische Rehabilitation“

Berufliche Tätigkeit:

- 11/04 – 04/05 Assistenzärztin in der Abteilung für Neurologie bei Professor
J.Touchon, Hôpital Gui de Chauliac,
Universitätsklinik Montpellier, Frankreich
- 05/05 - 12/06 Assistenzärztin in der Abteilung für Neurologie bei Professor
Dr. H. Topka, Krankenhaus München Bogenhausen,
Akademisches Lehrkrankenhaus der Technischen Universität
München
- 01/07 – 12/07 Assistenzärztin in der Abteilung für Interdisziplinäre
Intensivmedizin bei Frau Prof. Dr. E. Hoffmann,
Krankenhaus München Bogenhausen, Akademisches
Lehrkrankenhaus der Technischen Universität München
- Seit 01/08 Assistenzärztin in der Interdisziplinären Notaufnahme
(Präklinik) bei Herrn Prof. Dr. C. Dodt,
Krankenhaus München Bogenhausen, Akademisches
Lehrkrankenhaus der Technischen Universität München

8. Danksagung

In erster Linie möchte ich Herrn Professor Dr. G.F. Hamann danken, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir diese Arbeit überlassen hat. Darüber hinaus ermöglichte er mir die Teilnahme am DFG - Graduiertenkolleg 688 „Neurotraumatologie und neuropsychologische Rehabilitation“, die mir Einblicke in benachbarte Themengebiete und Methoden anderer Arbeitsgruppen verschafft hat.

Ebenso danke ich allen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe, insbesondere Herrn Dr. Dr. Helge K. Martens, der für die Durchführung des operativen Teils verantwortlich war, Frau Nathalie Wunderlich, die mich in die praktische Ausführung der weiteren Versuchsabläufe eingearbeitet hat, sowie Frau Dr. Dorothe Burggraf, die mich bei der Auswertung und der statistischen Bewertung der Ergebnisse, sowie der Gestaltung des theoretischen Teils unterstützt hat. Besonders möchte ich hier noch meinen Mitdoktoranden Herrn Dr. Matthias Pichler erwähnen, der dazu beigetragen hat die Ergebnisse dieser Arbeit erfolgreich zu veröffentlichen.

Mein persönlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium und damit die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben, sowie Frau Dr. Heike Stegmaier und Frau Dr. Katrin Wagner für die kritische Durchsicht der Arbeit.